

***Kofermentation  
heterologer Mikroorganismen als Quelle  
neuer Naturstoffe***

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Thomas Degenkolb  
geboren am 6. Februar 1972 in Jena

## Gutachter

1. Prof. Dr. habil. Udo Gräfe (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. habil. Werner F. Fleck (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
3. Prof. Dr. habil. Ulrike Lindequist (Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Tag des Rigorosums: 2.11. 2000

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.11. 2000



## Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen:

amu	„average mass unit“ (Masseneinheit)
n-BuOH	n-Butanol
br	breit (Bandenbreite im IR)
CID	„collision induced decomposition“ bzw. „collision induced decay“ (Stoßaktivierung)
d	Dublett (im IR)
DAD	„diode array detector“ (Diodenarray- bzw. Streulicht-Detektor)
DC	Dünnschicht-Chromatographie bzw. -Chromatogramm
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	„electron impact“ (Elektronenstoß)
ESI	„electrospray ionization“
EtOAc	Ethylacetat (Essigsäureethylester)
EtOH	Ethanol
FAB	„fast atom bombardment“
HPLC	„high performance liquid chromatography“ (Hochauflösende Flüssigchromatographie)
HR	„high resolution“ (Hochauflösung bei der Präzisionsmassenbestimmung)
IC <sub>50</sub>	inhibitorische Konzentration, bei der noch 50% der ursprünglichen Enzymaktivität vorhanden sind [µg/ml]
ICR	Ionencyclotron-Resonanz (Magnetische Ionenfalle)
IR	Infrarot-Spektroskopie
LC	„liquid chromatography“ (Flüssigkeitschromatographie)
LC/MS	Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer
LC/NMR	Kopplung der HPLC mit einem Kernresonanzspektrometer
LM	Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie
m	mittel (Bandenintensität im IR)
M	Molekülion
MALDI	„matrix associated laser desorption ionization“ (Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation)
MeCN	Acetonitril
Me <sub>2</sub> CO	Aceton

MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration eines Antibiotikums [ $\mu\text{g/ml}$ ]
mmu	„milli mass unit“ (Millimasseneinheiten, ppm)
MS	Massenspektrometer bzw. Massenspektrometrie (eine Messung im positiven Modus wird mit einem hochgestellten „+“ gekennzeichnet; eine Messung im negativen Modus mit einem hochgestellten „-“)
MS/MS	Erste Generation von Tochterionen im Triple-Quadrupol-MS ( $\text{MS}^2$ )
$\text{MS}^n$	Ion der n-ten Tochtergeneration im ESI-Ion-Trap-MS
$m/z$	Quotient aus Masse/Ladungszahl
NMR	Kernmagnetische Resonanz
$r_f$	Retentionsfaktor bei der DC: Quotient aus Laufstrecke der Substanz und Laufstrecke der Lösungsmittelfront
Rkst.	Rückstand
RP	„reversed phase“ (Umkehrphase)
sst	sehr stark (Bandenintensität im IR)
st	stark (Bandenintensität im IR)
Syn.	Synonym
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	„time-of-flight“ (Flugzeit-Analysator)
$t_r$	Retentionszeit einer Substanz in der HPLC [min]

## Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	6
1.1.	Aktuelle Trends und Perspektiven der Naturstoff-Forschung	6
1.2.	Kofermentation heterologer Mikroorganismen: Ein neuer methodischer Ansatz zur qualitativen Veränderung der Biosyntheseleistungen	11
1.3.	Aufgabenstellung	15
2.	Material und Methoden	17
2.1.	Rezepturen der verwendeten Nährmedien	17
2.2.	Rezepturen der verwendeten Reagenslösungen	18
2.3.	Methoden zur Charakterisierung der Substanzen	19
3.	Ergebnisse	
3.1.	Untersuchungen zur Kofermentation von <i>Verpa digitaliformis</i> m1046 und <i>Mycogone cervina</i> CBS 465.67	
3.1.1.	Untersuchungen an Reinkulturen von <i>Verpa digitaliformis</i> m1046	24
3.1.2.	Untersuchungen an Reinkulturen von <i>Mycogone cervina</i> CBS 465.67 und Kofermentation mit <i>Verpa digitaliformis</i> m1046	27
3.2.	Untersuchungen zur Kofermentation von <i>Macrolepiota</i> <i>procera</i> F 050 und <i>Mycogone rosea</i> DSM 12973	29
3.2.1.	Untersuchungen an Reinkulturen von <i>Mycogone rosea</i> DSM 12973	29
3.2.1.1.	Auswahl des Stammes <i>Mycogone rosea</i> DSM 12973 und erste Untersuchungen zur Struktur der produzierten Antibiotika	29
3.2.1.2.	Stammbeschreibung von <i>Mycogone rosea</i> DSM 12973	30
3.2.1.3.	Kultivierung des Stammes und präparative Isolierung des Roseoferin-Komplexes	31
3.2.1.4.	Physikochemische Eigenschaften des Roseoferin-Komplexes	
3.2.1.5.	Allgemeine Bemerkungen zur massenspektrometrischen Strukturanalytik von Peptiden	36
3.2.1.6.	Strukturaufklärung des Roseoferin-Komplexes durch massenspektrometrische Untersuchungen	
3.2.1.6.1.	ESI <sup>+</sup> -Triple-Quadrupol-CID-MS/MS- und ESI <sup>+</sup> -Ion-Trap-MS <sup>n</sup> - Untersuchungen der homologen Quasi-Molekül-Ionen	36
3.2.1.6.2.	Untersuchungen zur Struktur der Aminosäuren im salzsauren	

	Roseoferin-Hydrolysat	45
3.2.1.6.3.	Untersuchungen zur Struktur der N-terminalen Fettsäuren im salzsauren Roseoferin-Hydrolysat	47
3.2.1.7.	Biologische Aktivität des Roseoferin-Komplexes	52
3.2.1.8.	Untersuchungen zu qualitativen Strukturveränderungen des Roseoferin-Komplexes durch „Vorläufer-orientierte Biosynthese“	54
3.2.1.8.1.	Allgemeine Bemerkungen zur Modifizierung der Struktur von Peptid-Antibiotika durch „Vorläufer-orientierte Biosynthese“	54
3.2.1.8.2.	Optimierung der qualitativen Zusammensetzung des chemisch definierten Mediums	55
3.2.1.8.3.	Versuche zur Substratverwertung und Produktbildung von <i>Mycogone rosea</i> DSM 12973 bei Zufütterung verschiedener C- und N-Quellen	56
3.2.1.8.4.	Strukturelle Modifizierung der Roseoferine durch kombinierte Zufütterung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und L-4-Hydroxyprolin	61
3.3.	Ergebnisse der Kofermentation von <i>Mycogone rosea</i> DSM 12973 und <i>Macrolepiota procera</i> F 050	71
3.4.	Kofermentation von <i>Mycogone rosea</i> DSM 12973 und <i>Acremomium spec.</i> Tbp-5	71
3.4.1.	Auswahl des Stammes als <i>Acremomium spec.</i> Tbp-5 als Kofermentationspartner	71
3.4.2.	Die Acremostatine – Neue Lipoaminopeptide durch Kofermentation	72
3.4.3.	Ist <i>Acremomium spec.</i> Tbp-5 zu einer kofermentativen Umsetzung der Roseoferine befähigt ?	80
4.	Diskussion der Ergebnisse	84
4.1.	Bietet die Kofermentation heterologer Mikroorganismen Chancen für die Entdeckung neuer Naurstoffe ?	84
4.2.	Kofermentation von Wirtspilz und Mykoparasit: Ist die Bildung neuer Naurstoffe prognostizierbar ?	85
4.3.	Strukturen von Lipoaminopeptid- und Peptaibol-Antibiotika und mögliche Bedeutung dieser Substanzklassen für die Ökologie der mykophilen Produzenten	90
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	98
6.	Literaturverzeichnis	102

## ***1. Einleitung und Aufgabenstellung:***

### **1.1. Aktuelle Trends und Perspektiven der Naturstoff-Forschung:**

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind mehr als 150.000 Naturstoffe in der Literatur beschrieben [STEGLICH *et al.*, 1997]. Davon sind etwa 22.000 aus Mikroorganismen isolierte Substanzen [GRÄFE *et al.*, 2000 (a); LAATSCH, 1997]. Die letztere Zahl repräsentiert schätzungsweise jedoch nur etwa ein Zehntel der globalen Vielfalt mikrobieller Naturstoffe [BÉRDY, 1989].

Die systematische Suche nach pharmakologisch aktiven Substanzen mikrobiellen Ursprungs ist auf Grund von Resistenzentwicklungen und einer erheblichen Anzahl noch nicht bzw. nur symptomatisch therapierbarer Erkrankungen als eine nach wie vor bedeutende Aufgabe der modernen Biotechnologie zu bewerten. So sind insgesamt über 300 Infektionskrankheiten bekannt, von denen jedoch nur etwa 45% einer Arzneimittel-Therapie überhaupt zugänglich sind [SONNTAG, 1997].

Mehr als die Hälfte der auf dem Markt befindlichen Pharmazeutika und ein erheblicher Anteil der im land- bzw. forstwirtschaftlichen Sektor eingesetzten Produkte, wie Antibiotika, Zytostatika, Immunsuppressiva, Hormone, Biozide, Enzyminhibitoren und Antimetabolite, sind Naturstoffe bzw. von ihnen abgeleitete Derivate. Die Komplementarität, d. h. die Paßfähigkeit der Bindung an bestimmte biologische Targets, vor allem Proteine, stellt dabei den entscheidenden Vorteil der Naturstoffe gegenüber synthetisch hergestellten Wirkstoffen dar [FROBEL, 2000].

Partialsynthetische Modifizierungen von Naturstoffen mit bekannter chemischer Grundstruktur ermöglichen oftmals nur eine quantitative Verbesserung der biologischen Aktivität. Totalsynthesen haben sich oftmals, wie im Falle des Taxols, als schwierig durchführbar bzw. ökonomisch unrentabel erwiesen, da die Natur in der Lage ist, durch ein kompliziertes Netzwerk von Enzymen stereo- bzw. regioselektive Reaktionen auszuführen, die mit Hilfe klassisch- bzw. kombinatorisch-chemischer Methoden bisher nicht kostengünstig realisierbar sind.

Auf Grund der großen Anzahl bereits bekannter Naturstoffe ist jedoch ein permanent hohes Risiko der Wiederfindung bereits in der Literatur beschriebener Verbindungen gegeben. Daher ist die Anwendung geeigneter, die Screening-Effizienz erhöhender Strategien und Testmodelle für das Auffinden neuer Sekundärmetabolite für zukünftige Erfolge der



Naturstoff-Forschung von entscheidender Bedeutung. Ein Schema, das die Methoden zur Optimierung der Biodiversität im Screening nach neuen Naturstoffen illustriert, ist in **Abb. 1** dargestellt.

Prinzipiell wird zwischen biologischem, target-orientiertem Screening und „chemischem Screening“ unterschieden. Während beim chemischen Screening Substanzen ausschließlich auf Grund ihrer chromatographischen Aufarbeitung und Eigenschaften detektiert und isoliert werden, sucht man beim target-orientierten Screening gezielt nach Substanzen mit definierten biologischen Aktivitäten. Selbst bei Kombination dieser beiden Strategien zum sogenannten „chemisch-biologischen Screening“ [FIEDLER & FIEDLER, 1995; GRABLEY & THIERICKE, 1998] ist es jedoch unvermeidlich, daß bereits bekannte Naturstoffe zum wiederholten Male isoliert werden.

Eine wesentliche Möglichkeit zur Effektivierung des Screenings und Verbesserung der „Trefferquote“ bietet der routinemäßige Einsatz einer Reihe moderner Verfahren der instrumentellen Hochleistungs-Analytik, z.B. verschiedener Spray-MS-Ionisationstechniken, die mit Quadrupol- bzw. Ionenfallenanalysatoren gekoppelt sind, [LEHMANN, 1996; LOTTSPEICH & ZORBAS, 1998; HEINZE *et al.*, 1998; GRÄFE *et al.*, 2000 (a) und (b)]. Die Kopplung der HPLC mit NMR [LINDON *et al.*, 1995; LINDON *et al.*, 1996; HÖLZL *et al.*, 1996] und MS [NIESSEN & van der GREEF, 1992; LEHMANN, 1996; BAYER *et al.*, 1999] erwies sich als leistungsfähige Methode der Früherkennung, um - zum Teil bereits im Rohextrakt eines Mikroorganismus - Substanzen mit bekannter von solchen mit neuartiger chemischer Struktur unterscheiden zu können [KLEINWÄCHTER *et al.*, 1999].

Eine weitere Effektivierung des biologischen Screenings kann ferner durch die möglichst vollständige Ausnutzung der natürlichen biologischen Diversität erreicht werden. So trifft man eine gezielte Auswahl von Mikroorganismen aus ökologischen Nischen, die eine hohe chemische Diversität ihres Sekundärmetabolitenspektrums erwarten lassen. Die chemische Ökologie eines Mikroorganismus in seinem natürlichen Habitat kann nicht nur ein wichtiges Indiz, ja sogar eine Leitlinie bei der Suche nach neuen Naturstoffen darstellen. Die Untersuchung neuer, ungewöhnlicher Quellen von Naturstoffen, basierend auf der chemischen Ökologie der Produzenten, ermöglicht eine Vorhersage zu erwartender biologischer Aktivitäten und trägt somit zur Isolierung neuer Metabolite bei. Obwohl die Bedeutung solcher im Rahmen eines „ökologischen Screenings“ isolierter Substanzen für den produzierenden Mikroorganismus in den meisten Fällen nicht experimentell beweisbar ist, konnte in den letzten Jahren durch zahlreiche Beispiele gezeigt werden, daß die gezielte Bearbeitung bestimmter extrem spezialisierter ökologischer Gruppen von Mikroorganismen,

wie Bakterien und Pilze aus marinen Lebensgemeinschaften [LIBERRA & LINDEQUIST, 1995; EDRADA *et al.*, 2000] bzw. phyto-, entomo- und nematopathogener sowie endophytischer und koprophiler Pilze, eine wesentliche Strategie zur Erhöhung der Screening-Effizienz darstellt [GLOER, 1997]:

Von WICKLOW und HIRSCHFELD wurde 1979 beispielsweise berichtet, daß die koprophilen Ascomyceten *Poronia punctata*, *Preussia fleischhakii* und *Podospora decipiens* Substanzen produzierten, die das Wachstum des konkurrierenden Ascomyceten *Ascobolus furfuraceus* inhibierten. Mit diesen Vorgaben isolierten WEBER *et al.* 1988 im Rahmen eines gezielten Screenings – als ersten Sekundärmetaboliten der Gattung *Podospora* – aus *P. decipiens* das Podosporin A, eine neuartige Ringstruktur mit bemerkenswerter Aktivität gegen die humanpathogenen Species *Candida albicans* und *Trichophyton mentagrophytes*. Untersuchungen an verschiedenen *Preussia*-Species führten zur Isolierung der Preussomerine A – F aus *P. isomera*, welche ein bis dahin noch nicht in der Literatur beschriebenes Ringsystem enthalten [WEBER & GLOER, 1991]. Auf die Bedeutung von Mikroorganismen aus ökologischen Nischen für die Naturstoff-Forschung – selbst für den Einsatz in industriellen High-Throughput-Screening-Programmen – ist mehrfach verwiesen worden [BILLS, 1995; CAPORALE, 1995].

Da die meisten Pilze unter kompetitiven Umweltbedingungen gedeihen, wird verständlich, daß die Bildung fungaler Sekundärmetabolite maßgeblich durch den Selektionsdruck, der auf die Produzenten einwirkt, beeinflusst wird [GLOER, 1997]. Die An- oder Abwesenheit bestimmter kohabitierender Arten in einer Mikrobozönose kann somit als ein entscheidender Faktor für eine Induktion oder Repression bestimmter metabolischer Aktivitäten einer anderen Species betrachtet werden.

Daher stellt die Fähigkeit zur Synthese von Sekundärmetaboliten, wie Antibiotika, Auto- und Bioregulatoren, Enzyminhibitoren und Antimetaboliten [GRÄFE, 1992 und dort zitierte Referenzen], einen entscheidenden evolutionären Vorteil dar, um Konkurrenten ganz oder teilweise von dem besiedelten Habitat auszuschließen, wobei gleichzeitig Toleranz gegen Hemmstoffe anderer Organismen entwickelt wird. Daher können auch bereits durch andere Mikroben besiedelte Standorte erobert werden [CAMPBELL, 1981].

Die zielgerichtete Suche nach Bildnern biologisch aktiver Sekundärmetabolite mit hoher chemischer Diversität sollte daher in wesentlich stärkerem Maße als bisher auf die Untersuchung von Arten aus ökologischen Nischen und Mikrohabitaten ausgeweitet werden, da gewisse metabolische Kontrollmechanismen als Folge der Adaptation dieser Organismen an ihre zum Teil extreme Umgebung fehlen könnten [ŌMURA, 1992].

Da der Erfolg eines zeitgemäßen biologischen Screenings maßgeblich von der Effizienz der verwendeten Assays bestimmt wird [LANCINI & LORENZETTI, 1993; von DÖHREN & GRÄFE, 1997], besteht die Notwendigkeit zur Anwendung spezifischer Testmethoden, welche ein zielgerichtetes Screening unter besonderer Berücksichtigung der chemischen Ökologie der Mikroorganismen ermöglichen.

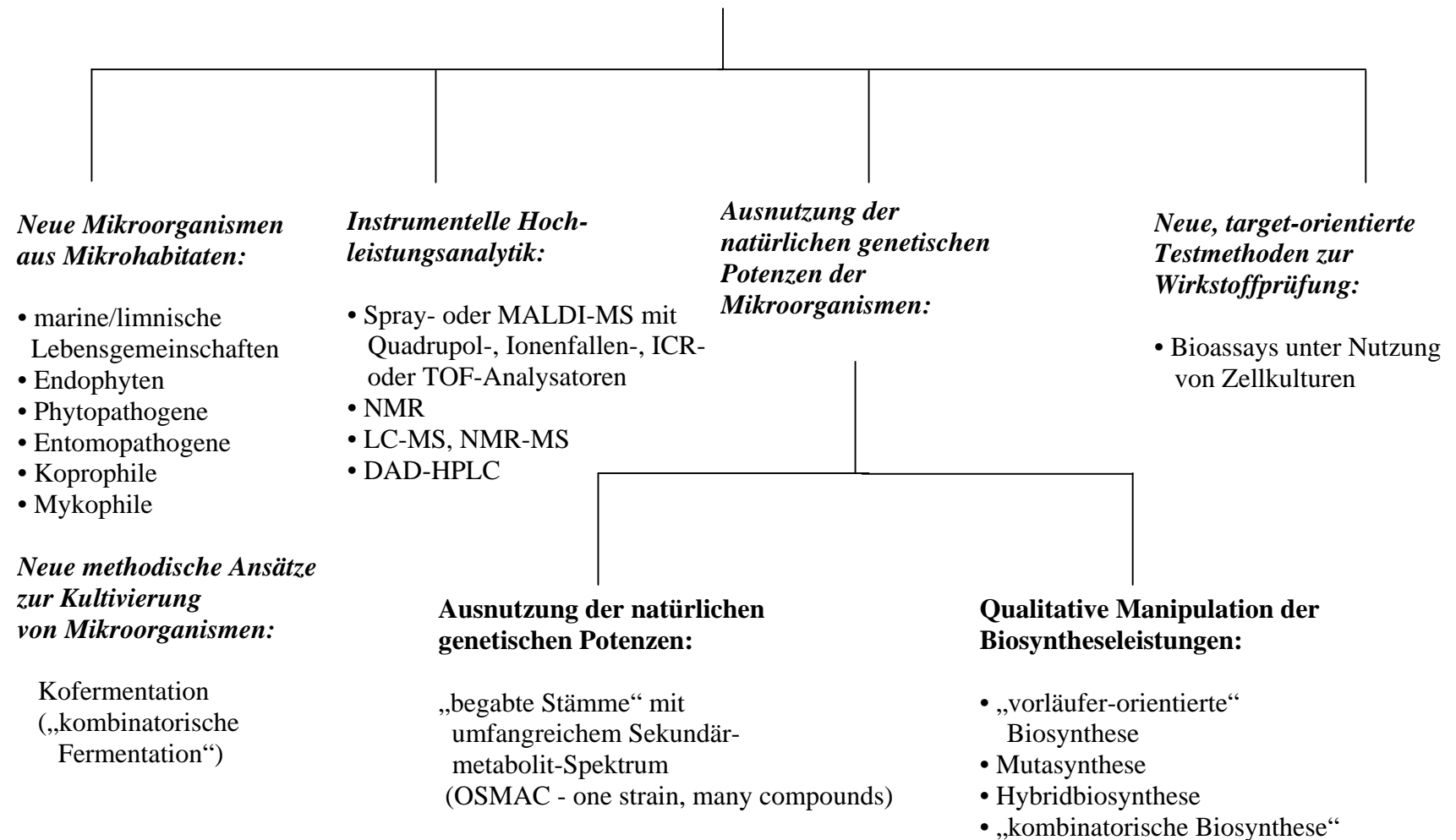
Zur qualitativen Veränderungen von Biosyntheseleistungen finden neben genetischen Manipulationen des produzierenden Mikroorganismus folgende physiologische Standardmethoden routinemäßige Anwendung [von DÖHREN & GRÄFE, 1997]:

Bei der vorläufer-orientierten Biosynthese (directed biosynthesis) wird die Bereitstellung von Intermediaten aus dem Stoffwechsel durch Ausnutzung der natürlichen Stoffwechselregulation, den Einsatz metabolischer Inhibitoren, Präkursorlimitation (Auxotrophie, Nährstoffmangel) oder Überschuß eines Präkursors beeinflusst. So werden Biosynthesestufen häufig in den Wirkstoff eingebaut, wenn sie dem Medium zugesetzt werden. Beispielsweise finden anstelle eines „nativen“ Präkursors auch dessen strukturelle Derivate bzw. Intermediate der Biosynthese Anwendung, wobei neue „nicht-biogene“ Metabolite [KOBEL & TRABER, 1982; TRABER *et al.*, 1989], wie z. B. fluorierte Substanzen [AWAZU *et al.*, 1995], erhalten werden. In den letzten Jahren wurde über Umsetzungen von „Vorläufer-Molekülen“ (Präkursoren) durch zellfreie Enzympräparationen berichtet (siehe Cyclosporin-Synthase von *Beauveria niveum*, Enniatin-Synthetase aus *Fusarium oxysporum*, Gramicidin S-Synthasen aus *Bacillus brevis* [von DÖHREN & GRÄFE, 1997; KLEINKAUF & von DÖHREN, 1999]).

Für die sogenannte „Mutasyntese“ (mutational biosynthesis) finden idiotrophe Blockmutanten Verwendung, deren Wirkstoffproduktion durch den Ausfall eines intermediären Biosynthese-Schritts inhibiert ist. Bei Zusatz bestimmter auf chemosynthetischem Wege hergestellter Analoga des betreffenden natürlichen Intermediats bzw. Analoga des natürlichen Intermediats, die durch idiotrophe Stämme gebildet werden, wird der Biosynthese-Block ausgeglichen. Es kommt zum Einbau des Analogons und somit zur Bildung struktureller Varianten des ursprünglichen Naturstoffs [DUTTON *et al.*, 1991].

In ähnlicher Weise wie bei der Mutasyntese, werden zur sogenannten „Hybrid-Biosynthese“ (hybrid biosynthesis) Stämme verwendet, bei denen ein bestimmter Schritt eines

## Optimierung der Biodiversität im Screening nach neuen Naturstoffen



**Abb. 1:** Methoden zur Optimierung der Biodiversität im Screening nach neuen Naturstoffen

Sekundärmetabolit-Biosynthesewegs, z. B. infolge Mutagenese oder Anwesenheit spezifischer Stoffwechsellinhibitoren, geblockt ist [SADAKANE *et al.*, 1983]. Auf Grund dieser Blockade kommt es zu einer Akkumulation bestimmter Biosynthese-Intermediate, wie z.B. des Protylonolides in idiotrophen Stämmen von *Streptomyces fradiae*. Bei Fütterung solcher Intermediate an andere Species, z.B. *Streptomyces ambofaciens*, mit einem Block in der Biosynthese strukturell ähnlicher Sekundärmetabolite, z.B. des Spiramycinolactons, kann das zugesetzte Vorläufer-Analogon anstelle des fehlenden nativen Metaboliten in das Produkt eingebaut werden. Auf diese Weise kommt es zur Erzeugung von Hybridstrukturen bestimmter Sekundärmetabolite, z.B. der Chimeramycine, zweier heterologer Mikroorganismen.

## **1.2. Kofermentation heterologer Mikroorganismen - Ein neuer methodischer Ansatz zur qualitativen Veränderung der Biosyntheseleistungen:**

Da Mikroorganismen in der Natur fast stets als Gemeinschaft mehrerer Gattungen bzw. Arten vorkommen, spiegelt die bisherige Orientierung der Biotechnologie auf das Arbeiten mit taxonomisch definierten Reinkulturen von Mikroben nicht die Gegebenheiten einer Mikrobozönose am natürlichen Standort wider. Sofern nicht Umweltbedingungen vorherrschen, die das Überleben nur einer bzw. weniger extrem spezialisierter Arten an einem Standort ermöglichen, ist stets von der Existenz von Mikrobengesellschaften auszugehen. Zwischen den Mitgliedern einer solchen Mikrobozönose wird es zur Konkurrenz um solche Nährstoffe kommen, die in limitierenden Konzentrationen vorhanden sind [CAMPBELL, 1981]. Andererseits kann das Zusammenwirken der Abbau- und Syntheseleistungen verschiedener Partner in einer Gemeinschaft von Mikroorganismen bei der Erschließung neuer Substrate eine ganz entscheidende Rolle spielen. Dies ist bei der sogenannten „Protokooperation“ zweier Stämme, z. B. in einer Anreicherungskultur von *Pseudomonas stutzeri* mit *Pseudomonas aeruginosa*, der Fall:

*Ps. stutzeri* ist in der Lage, das Insektizid Parathion zu hydrolysieren, vermag jedoch nicht, das als Spaltprodukt entstehende p-Nitrophenol zu assimilieren; nutzt jedoch Ausscheidungsprodukte von *Ps. aeruginosa* zur kometabolischen Hydrolyse und zum Wachstum. Dieser ist wiederum in der Lage, auf p-Nitrophenol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen [FRITSCH, 1985].

Daher ist Grund zu der Annahme gegeben, daß infolge der wechselseitigen Beeinflussung zweier Stämme von Mikroorganismen auf einem Substrat in Mischfermentation andere

Sekundärmetabolite als in Reinkultur gebildet werden. Bedingt durch den Wegfall bestimmter Interaktionen zwischen Mikroorganismen verschiedener Arten, könnten charakteristische und somit nachweisbare Veränderungen im Spektrum der gebildeten Sekundärmetabolite auftreten. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung untermauert, daß die Fremdinfection eines Fermentationsansatzes in der Regel zu signifikanten qualitativen Veränderungen des Produktspektrums führt.

Bisher liegen noch keine systematischen Erfahrungen über Veränderungen von Wachstum und Produktbildung von Mikroorganismen unter Kofermentationsbedingungen vor; denn die Anwendung der Kofermentationsstrategie wird bekanntermaßen durch eine Reihe von biologischen Faktoren, wie die unterschiedlichen Wachstumsraten der verwendeten Mikroorganismen, limitiert [TANAKA, 1992]. Synergistische und antagonistische Interaktionen zwischen den beteiligten Organismen werden zudem durch Temperatur, Luftfeuchtigkeit und ggf. die Virulenz der getesteten Isolate beeinflußt [WHIPPS, 1987; JEFFRIES & YOUNG; 1994]. So verweisen GAMS *et al.* [1999] einerseits auf den erheblichen Einfluß des verwendeten Kulturmediums auf die Antibiotika-Produktion in Kokulturen und empfehlen daher die strikte Trennung von Effekten, die durch antibiotische und flüchtige Substanzen hervorgerufen werden, von anderen in Kokultur beobachteten Interaktionen. Andererseits wird auf Grund von Einzelergebnissen sichtbar, daß eine gemeinsame Kultivierung heterologer Mikroorganismen zur Bildung neuer chemischer Strukturen führen kann. So berichtete MOESCHLER [1994] über die Bildung von Amblyomycin durch Mischkulturen eines Pilzes und eines Bakteriums.

Um dem schon diskutierten Anspruch einer den Bedingungen am natürlichen Standort näherkommenden Fermentationsstrategie zu genügen, wurde als Ausgangspunkt für die Untersuchungen ein in der Natur vorkommendes System ausgewählt, das aus Pilzwirt und mykophilem, d.h. parasitisch bzw. symbiontisch auf dem bzw. im Fruchtkörper oder im Mycel des Wirts lebendem, „Pilz-Partner“ besteht [HAWKSWORTH, 1981; GAMS *et al.*, 1999]. Die Bearbeitung dieser ökologischen Gruppe als Partner für Kofermentationen erschien aus zwei Gründen als vorteilhaft:

- Es handelt sich um taxonomisch definierte Systeme; unter natürlichen Bedingungen werden bestimmte systematische Gruppen von Wirtspilzen nur von relativ wenigen mykophilen Parasiten oder Saprophyten befallen. Die zu untersuchenden

Wechselwirkungen zwischen den Kofermentationspartnern bleiben daher in ihrer Komplexität überschau- und interpretierbar.

- Symbiontische und parasitische Pilze auf Pilzfruchtkörpern gehören nicht zu den „klassischen“ Organismen, die bisher eine eingehende Bearbeitung im Rahmen der biotechnologischen bzw. naturstoffchemischen Forschung erfahren haben. Dieser Fakt erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von Verbindungen mit neuartiger chemischer Struktur und interessanten biologischen Aktivitäten im Screening.

Die Taxonomie, Physiologie und chemische Ökologie der meisten mykophilen Pilze stellen bisher noch relativ unerforschte Teilgebiete der Mykologie dar, obwohl diese ökologische Gruppe von Organismen mehr oder weniger ubiquitär verbreitet ist. Während der letzten Jahre sind eine Reihe bisher noch nicht klassifizierter Species, ja sogar Ordnungen [OBERWINKLER *et al.*, 1990] von Mykoparasiten beschrieben worden. Da das taxonomische Spektrum potentieller Wirte fungicoler Pilze im Falle der Basidiomyceten als nahezu unbekannt eingeschätzt wird, gilt die Isolierung neuer Arten vor allem aus Sporenabwurfpräparaten von Basidiomyceten als wahrscheinlich [LANGER, E.; persönliche Mitteilung 09/1998]. Es ist sogar davon auszugehen, daß überall dort, wo Pilze vorkommen, mit dem Auftreten mykophiler Species zu rechnen ist. Von GAMS *et al.* [1999] werden insgesamt 723 mykoparastische und 854 lichenicole Species angegeben; wobei diese Autoren – im Gegensatz zu RUDAKOV [1978] und HAWKSWORTH [1981] - eine klare Abtrennung der Mykoparasiten von rein saprophytischen Kolonisten auf Pilzfruchtkörpern vornehmen.

Zum einen kommen sog. polyphage, d. h. unspezifische Mykoparasiten, wie *Gliocladium roseum*, *Calcarisporium arbuscula*, *Trichothecium roseum* und vor allem Arten der Gattungen *Verticillium* und *Trichoderma*, die ein relativ breites Spektrum von Wirtspilzen befallen, vor. Innerhalb dieser Gruppe sind auch sog. Hyperparasiten zu finden, die in der Lage sind, das Wachstum anderer Mykophiler zu inhibieren, wie im Falle der Interaktion von *Acremonium strictum* und dem Mykoparasiten *Mycogone perniciosus* [GANDY, 1979].

Andererseits sind auch hochspezialisierte Interaktionen beschrieben worden: Die das Mycel invadierende *Harziella capitata* wurde bisher ausschließlich an befallenen, völlig deformierten Fruchtkörpern von *Lepista nuda* [DÖRFELT, H.; persönliche Mitteilung 08/1998] bzw. *Lepista cf. sordaria* [HELFER, 1991] beobachtet. Der extrem spezialisierte biotrophe Hyperparasit *Gliocephalis hyalina* ist lediglich in der Lage, auf seinem Wirtspilz *Cylindrocarpon destructans* zu wachsen [GAMS *et al.*, 1999].

Der Terminus „Mykoparasitismus“ ist im eigentlichen Sinne nur dann adäquat anzuwenden, wenn ein lebender Wirtspilz als Nährstoffquelle eines anderen Pilzes dient, obwohl diese Art von Interaktion bisher nur in sehr wenigen Fällen experimentell bewiesen werden konnte [JEFFRIES, 1995]. Generell wird hierbei zwischen biotrophem und nekrotrophem Mykoparasitismus unterschieden, wobei fünf prinzipielle Subtypen differenziert werden [JEFFRIES, 1995]. Diese verschiedenen Formen des Mykoparasitismus sind jedoch in den seltensten Fällen exakt voneinander trennbar, und es existieren eine Reihe intermediärer Formen. Daneben sind einerseits taxonomisch exakt definierte, jedoch rein saprophytische bzw. kommensalistische Assoziationen beschrieben, in denen ein mykophiler Pilz seinen Wirt nicht bzw. kaum schädigt [JEFFRIES & YOUNG, 1994]. Es existieren andererseits auch Spezialisten, bei denen die jeweilige trophische Beziehung in Abhängigkeit vom aktuell befallenen Wirtspilz determiniert wird [RUDAKOV, 1978].

Die Produktion antifungal wirksamer Sekundärmetaboliten ist für ein breites Spektrum mykophiler Pilze nachgewiesen worden [SCHNEIDER *et al.*, 1997; TEZUKA *et al.*, 1997]. In der Literatur sind eine Reihe mykophiler Species der Gattungen *Trichoderma* und *Verticillium* beschrieben, die – auf Grund starker antibiotischer *in-vivo*-Effekte - bereits als Biofungizide eingesetzt werden. Neben phenolischen Komponenten [MORRIS *et al.*, 1995], werden von diesen Stämmen eine Reihe terpenoider Verbindungen und Peptaibole produziert [HUANG *et al.*, 1995 (a) und (b)]. Daneben sind für eine Anzahl mykophiler Hypomycetaceen Naphtho- und Anthrachinone beschrieben [Übersicht in HELFER, 1991], die - in Kombination mit ökologischen, morphologischen und physiologischen Charakteristika – als chemotaxonomisch relevante Pigmente zu bewerten sind.

Verschiedene Hinweise lassen vermuten, daß biotrophe Mykoparasiten, wie *Harziella capitata*, welche ihre Wirtspilze mit Hilfe von Haustorien oder anderen speziellen Penetrationshyphen attackieren, weitaus weniger zellwandlysierende Enzyme und antifungale Substanzen produzieren. Nekrotrophe Mykoparasiten, wie *Hypomyces rosellus*, biosynthetisieren hingegen Antibiotika und lysieren enzymatisch die Zellwände der Hyphen ihrer Wirtspilze, so daß es schließlich zur Degeneration des Zytoplasmas kommt. Sie besitzen jedoch nicht die Fähigkeit zur Ausbildung differenzierter morphologischer Strukturen, die eine mechanisch-chemische Penetration ermöglichen [JEFFRIES, 1995; GAMS *et al.*, 1999]. Einerseits verweist HELFER [1991] auf die Schwierigkeiten von *in-vitro*-Untersuchungen an *Hypomyces chrysospermus*, da die Fruchtkörperbildung der Wirte dieses Parasiten in Kultur nicht induzierbar ist; demonstriert jedoch andererseits, daß alle vier der ausgewählten Isolate von *Hypomyces chrysospermus* (Syn.: *Apiocrea chrysosperma*, *Hypomyces chrysospermus*) in



der Lage waren, das Wachstum von 23 der 28 getesteten Wirtspilz-Arten innerhalb der Boletales, Sclerodermatales und Melanogastrales und eine Reihe von Pilzen anderer Ordnungen vollständig zu inhibieren. Für 17 der 23 geprüften Wirtspilze wurde zudem eine vollständige Lysis der Zellwand durch den Mykoparasiten beobachtet. Letzterer Effekt wird offenbar durch noch nicht näher untersuchte Enzyme verursacht. Es bleibt hingegen offen, in welchem Umfange die relativ hohe Substratspezifität dieses Mykoparasiten durch seine in der Literatur beschriebenen Sekundärmetabolite, wie die Tropolone Sepedonin und Anhydrosepedonin, die Anthrachinone Chrysodin und Skyrin, oder das Polyketid Compactin, verursacht wird.

Am HKI wurden im Zeitraum von 1995 bis 1999 insgesamt 18 neue Peptaibole und Lipoaminopeptide mit z.T. bemerkenswerten biologischen Wirkungen gefunden [GRÄFE *et al.*, 1995; GRIGORIEV *et al.*, 1996; DORNBERGER *et al.*, 1995; GRIGORIEV *et al.*, 1995; RITZAU *et al.*, 1997; GRIGORIEV *et al.*, 1997; HEINZE *et al.*, 1999; HEINZE *et al.*, 1997; CHRISTNER *et al.*, 1997; BERG *et al.*, 1996; BERG *et al.*, 1999; HÜLSMANN *et al.*, 1998]. Dreizehn davon wurden aus Reinkulturen mykophiler Pilze erhalten – ein Sachverhalt, der ein weiteres gewichtiges Argument für die gezielte Bearbeitung von Vertretern dieser ökologischen Gruppe von Mikroorganismen darstellt.

Zusammengefaßt ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die Ökologie mykophiler Pilze, einschließlich der interspezifischen allelopathischen Biokommunikation zwischen Wirt und Mykoparasit, z. B. durch Sekundärmetabolite, bisher nur in Ansätzen verstanden worden ist. Diese Tatsache belegt die offenkundigen Probleme bei der Übertragung der Resultate von *in-vitro*-Studien auf das in der freien Natur unter hochspezifischen Bedingungen auftretende Phänomen des Mykoparasitismus. Die fehlenden Informationen belegen zugleich die Existenz von Freiräumen für die mikrobiologische und biotechnologische Forschung, die auf die Erschließung der chemischen Diversität von Naturstoffen und ihre Herstellung gerichtet ist. Die chemische Diversität der während der letzten Jahre aus mykophilen Pilzen isolierten und oftmals pharmakologisch hochaktiven Naturstoffe demonstriert die Potenz dieser Organismen für eine weitere intensive und zielgerichtete Bearbeitung.

### **1.3. Aufgabenstellung:**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß der Kofermentation heterologer Mikroorganismen auf das Produktspektrum der einzelnen Partner untersucht werden. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob neue biologische Aktivitäten durch

Kofermentation („kombinatorische Fermentation“) taxonomisch verschiedener Arten von Mikroorganismen entstehen und ob diese Strategie als neue, allgemein anwendbare Methode zur Vergrößerung der biologischen Strukturdiversität eingesetzt werden kann. Bei der Auswahl der Partner wurde davon ausgegangen, daß Arten, die sich durch gemeinsame Besiedelung ökologischer Nischen, wie z. B. Wirtspilz und Mykoparasit, auszeichnen, vorrangig bearbeitet werden sollen. Die Aufgabenstellung der Dissertation wurde in drei Arbeitsphasen realisiert:

1. Um den Gegebenheiten am natürlichen Standort der Mikroorganismen möglichst nahe zu kommen, waren zunächst geeignete, in der Natur vorkommende Kombinationen aus einem Wirtspilz und mykophilem Partner auszuwählen. Diese mußten mit vertretbarem Zeit- und Arbeitsaufwand unter Laborbedingungen kultiviert werden können.
2. Die Kultivierungsbedingungen des gewählten Modellsystems, d. h. Wachstum und Produktbildung, waren jeweils in Rein- und Mischkultur bei systematischer Variation der Kultivierungsbedingungen zu untersuchen. Von besonderem Interesse war hierbei eine vergleichende Bearbeitung des Musters der gebildeten Sekundärmetabolite der Partner, so z. B. von Pilzwirt und Mykoparasit, unter den Bedingungen der Rein- und Mischkultur. Die in den Reinkulturen der jeweiligen Partner auftretenden Leitmetabolite waren in ihrer chemischen Struktur und ihren biologischen Aktivitäten zu charakterisieren, so daß qualitative Veränderungen unter Kofermentationsbedingungen erfaßt werden konnten. Dabei fanden neben den klassischen chromatographischen Methoden zur Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen die am HKI etablierten Verfahren der modernen instrumentellen Hochleistungs-Analytik, wie Diodenarray-HPLC, ESI-Triple-Quadrupol-MS, ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup>-, HRESI-MS sowie verschiedene ein- und zweidimensionale Methoden der NMR-Spektroskopie, einschließlich der LC-MS- und LC-NMR-Kopplung, Verwendung.
3. Die dabei erarbeiteten Ergebnisse über die Kofermentation heterologer Mikroorganismen wurden auf die gemeinsame Kultivierung mit Bildnern bekannter Sekundärmetabolite angewandt: Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob Kofermentationen zweier produktbildender Mikroorganismen „*in-situ*“-Biotransformationen unter Bildung neuer Produkte durchführen können. Die Vorgehensweise entsprach der unter 2. beschriebenen Methodik.

## **2. Material und Methoden:**

### **2.1. Rezepturen der verwendeten Nährmedien:**

Sofern nicht anders angegeben, entstammen die Rezepturen der zur Kultivierung der Pilzstämme verwendeten Nährmedien der Vorschriftensammlung der AG Nährbodentechnik/Inaktivierung des Hans-Knöll-Instituts für Naturstoff-Forschung Jena e. V. Die Mengenangaben erfolgen in g/l. Die Azidität der Medien wurde mittels 10%iger NaOH bzw. 10%iger HCl eingestellt. Bei der Bereitung von Agarnährböden wurde die in Klammern angegebene Menge Agar-Agar zugesetzt. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser zum Liter aufgefüllt. Die Sterilisation aller Medien erfolgte für 35 min im Autoklaven bei 121°C und 1 bar Überdruck.

#### Malzagar:

Malzextrakt: 40; Hefeextrakt: 4; Agar-Agar: 15; pH 6,0

#### Malzmedium:

Malzextrakt: 20; Glucose: 10; Hefeextrakt: 2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,5; pH 6,0

#### Moser-b-Medium [MOSER, 1958]:

Malzextrakt: 50; Bohnenmehl, feingemahlen: 10\*; Peptisches Caseinpepton: 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5; MgSO<sub>4</sub>, wasserfrei: 0,5; FeCl<sub>3</sub>: 0,01; Hefeextrakt: 0,1; (Agar-Agar 15); pH natursauer (7,7 – 7,9 vor Sterilisation; 6,0 – 6,2 nach Sterilisation)

\*Das Bohnenmehl wurde aus handelsüblichen getrockneten roten Bohnen selbst bereitet [GAMS, W.: persönliche Mitteilung 05/1997].

#### Modifizierter Synthetischer Agar (MSA):

Maltose: 8; Ammoniumtartrat, wasserfrei: 4; NaCl: 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2; MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O: 1; CaCl<sub>2</sub>, wasserfrei: 0,2; MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 0,01; (Agar-Agar 15); pH 7,3 (natursauer)

#### MID-Medium [PINKERTON *et al.*, 1976; modifiziert nach STROBEL *et al.*, 1997]:

Saccharose bzw. Maltose: 30; Ammoniumtartrat, wasserfrei: 5; Bacto-Soytone: 1; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O: 0,285; KNO<sub>3</sub>: 0,08; KCl: 0,065; MgSO<sub>4</sub>, wasserfrei: 0,360; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O: 0,025;

Spurenelemente-Lösung [mg/l]:  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ : 2;  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ : 5; KI: 0,7;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 1,5;  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ : 2,5; pH 5,5

Wb 6-1/14-Medium mit  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ :

Maltose: 40;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 3,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 2;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ : 0,5;  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ : 0,08;  $\text{CaCO}_3$ : 5,1 (Agar-Agar 15) pH 6,0; evtl. Zusatz der Spurenelemente-Lösung des MID-Mediums (siehe oben)

## **2.2. Rezepturen der verwendeten Reagenslösungen:**

Die Rezepturen entstammen der Vorschriftensammlung der Abteilung Biostrukturchemie des des Hans-Knöll-Instituts für Naturstoff-Forschung Jena e. V.

Vanillin-Schwefelsäure-Sprühareagens:

Vanillin 0,5 g; Methanol 85 ml; Eisessig: 10 ml;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96%ig): 5 ml. Die Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge vorsichtig miteinander vermischt. Dabei darf keine Gelbfärbung der Lösung auftreten. Die Detektion der besprühten Chromatogramme erfolgte nach Erhitzen auf 120°C.

KILLANDERs Biuret-Reagens [ŠEVČIK, 1963]:

40 ml einer 5%igen Lösung von Kupfer-(II)-acetat wurden mit 10 ml 50%iger NaOH und 2,5 ml Glycerin vermischt und mit 96%igem Ethanol auf 100 ml aufgefüllt.

DRAGENDORFFs Reagens (Kaliumtetraiodobismutat-(III)-Reagenz):

Eine Mischung aus 1,7 g basischem Bismutnitrat, 20 g Weinsäure und 80 ml destilliertem Wasser wurde unter wiederholtem Schütteln 24 h stengelassen und anschließend mit der Lösung von 16 g KI in 40 ml destilliertem Wasser versetzt. Nach 48 h wurde die Mischung filtriert. Diese Stammlösung ist kühl und vor Licht geschützt aufzubewahren. Bei Bedarf wurden 5 ml dieser Lösung mit der Lösung von 10 g Weinsäure in 50 ml destilliertem Wasser und 0,25 g Ascorbinsäure versetzt. Zur Löschung des gelbbraunen Hintergrundes können die besprühten und auf 120°C erhitzten Chromatogramme nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit einer 5%igen wässrigen  $\text{NaNO}_2$ -Lösung nachbehandelt werden, wobei die orangeroten bis braunen Substanzflecken erhalten bleiben.

### Phosphatpuffer nach SÖRENSEN:

Die Einstellung der Azidität erfolgte durch Mischung zweier jeweils 0,1M wäßriger Stammlösungen von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

## **2.3. Methoden zur Charakterisierung der Substanzen:**

### Zweiphasen-Transfertest zum Nachweis lipophiler tertiärer Amine mit ionophoren

#### Eigenschaften [STENGEL *et al.*, 1992 ]:

Zwei ml Toluol wurden mit 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 versetzt, 50 – 250 µl Testlösung in Toluol zugegeben, intensiv geschüttelt und nach 5minütiger Zentrifugation der Mischung bei 5000 U/min die Färbung der organischen Oberphase registriert. Danach wurden 100 µl einer 0,1%igen wäßrigen Lösung von Methylorange (Helianthin) zugesetzt, wiederum wurde intensiv geschüttelt und zentrifugiert. Bei Anwesenheit phasentransferaktiver Substanzen kam es zu einer Gelbfärbung der organischen Oberphase.

### Hydrolyse von Peptiden:

10 mg Peptid wurden eingewogen, in ein Hydrolyseröhrchen überführt und mit 10 ml 6 N HCl versetzt. Durch dreimaliges abwechselndes Evakuieren und Begasen mit Argon wurde der Luftsauerstoff weitestgehend entfernt und das evakuierte Röhrchen 24 Stunden im Ölbad eines thermostatierten Metallblocks auf 120°C erhitzt. Danach wurde die Salzsäure *in vacuo* bei 50°C weitestgehend abdestilliert. Zur vollständigen Entfernung der Salzsäure wurde der Rückstand in 1 ml destillierten Wasser aufgenommen, die Lösung *in vacuo* zur Trockne eingengt und diese Prozedur noch zweimal wiederholt. Der verbleibende Rückstand wurde in 1 ml 0,1 N HCl aufgenommen und diese Lösung bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von 4°C gelagert.

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse wurde der nach der Entfernung der Salzsäure verbleibende Rückstand in 1 ml MeOH : H<sub>2</sub>O = 99 : 1 aufgenommen. 20 µl dieser Lösung wurden im ESI<sup>+</sup>-Triple-Quadrupol-MS analysiert.

Charakterisierung von Aminosäuren durch Derivatisierung mit  $N^2$ -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-1-L-alanin-amid (FDAA, MARFEYs Reagenz) [BRÜCKNER & KELLER-HOEHL, 1990]:

a.) Herstellung der Meßlösungen:

1 g FDAA wurde zu 100 ml in Aceton gelöst. Ein ca. 2  $\mu$ M Aminosäure enthaltendes Volumen der Hydrolysatlösung wurde *in vacuo* zur Trockne eingengt, mit 40  $\mu$ l 0,5 M wäßriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung intensiv gemischt und mit 80  $\mu$ l FDAA-Lösung versetzt. Nach einstündigem Erwärmen auf 40°C in einem thermostatierten Metallblock wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 10 ml 2 N HCl versetzt und mit 2,37 ml DMSO auf 2,5 ml Meßlösung aufgefüllt. Zur Bereitung von Standardlösungen wurden 1 mg des D- bzw. L-Isomers einer jeden Aminosäure bzw. 2 mg eines Racemats nach obiger Vorschrift umgesetzt. Die Standard- bzw. Meßlösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von 4°C gelagert.

b.) Triethylammoniumphosphatpuffer, pH 3,0:

6,93 ml Triethylamin wurden mit 950 ml Wasser verdünnt, mit 85%iger ortho-Phosphorsäure auf pH 3,0 eingestellt und mit Wasser zu 1 l aufgefüllt.

c.) HPLC-Analytik der FDAA-Aminosäure-Derivate:

Die Analytik der FDAA-Aminosäure-Derivate wurde mit einem analytischen HPLC-Gerät der Firma Abimed-Gilson unter Verwendung der UniPoint-Software durchgeführt:

Säule	Lichrospher 100, $\text{C}_{18}$ , 5 $\mu\text{m}$ , (250 x 4) mm
Flußrate	1,5 ml/min
Detektionswellenlänge	350 nm
Eluent A	Triethylammoniumphosphat pH 3,0 : MeCN = 9 : 1
Eluent B	Triethylammoniumphosphat pH 3,0 : MeCN = 1 : 1

Zeit [min]	% Eluent A	% Eluent B
0	100	0
12	60	40
24	50	50
45	0	100
50	100	0

Das entsprechende LL-Diastereomer einer Aminosäure weist, bedingt durch die intramolekulare Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäure und der Carboxamat-Gruppe des Reagens, die geringeren Retentionszeiten als das korrespondierende DL-Diastereomer auf. Mit der Methode ist die überwiegende Anzahl proteinogener und nicht-proteinogener Aminosäuren bestimmbar.

#### Bestimmung von Fettsäuren im Peptidhydrolysat:

10 mg Peptid wurden eingewogen, in ein Hydrolyseröhrchen überführt und mit 10 ml 6 N HCl versetzt. Durch dreimaliges abwechselndes Evakuieren und Begasen mit Argon wurde der Luftsauerstoff weitestgehend entfernt und das evakuierte Röhrchen 24 Stunden im Ölbad eines thermostatierten Metallblocks auf 120°C erhitzt.

Das erkaltete Hydrolysat wurde nachfolgend dreimal mit dem gleichen Volumen an CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels im Kaltluftstrom wurde der verbleibende Rückstand in 1 ml MeOH : H<sub>2</sub>O = 99 : 1 aufgenommen und 20 µl dieser Lösung im Triple-Quadrupol-ESI-MS analysiert.

Parallel hierzu wurden je 20 µl dieser Lösung mit einem HPLC-gekoppelten ESI-Ion-Trap-Massenspektrometer, jeweils im positiven und negativen Modus, vermessen:

Säule	YMC-Pack ODS-AQ, 5 µm, 120Ⓢ, (150 x 3) mm
Flußrate	0,5 ml/min
Detektionswellenlänge	210 nm
Eluent A	2 mM Ammoniumformiat
Eluent B	MeCN

Zeit [min]	% Eluent A	% Eluent B
0	100	0
1	99,5	0,5
16	0,5	99,5
17	0,5	99,5
21	99,5	0,5
25	99,5	0,5

#### Darstellung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen [LAATSCH, 1988]:

1 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurde mit 5 Tropfen 96%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und diese Lösung mit 2 ml absolutem EtOH verdünnt. Die nun blaßgelbe Lösung wurde mit 1 mg Analysensubstanz, gelöst in 250  $\mu\text{l}$  absolutem EtOH, versetzt und intensiv gemischt, wobei der Farbton der Lösung nach gelb umschlägt. Das gebildete 2,4-Dinitrophenylhydrazon wurde mit 5 ml destilliertem Wasser bei einer Temperatur von  $4^\circ\text{C}$  für 48 Stunden ausgefällt, danach von der Mutterlauge abgetrennt, *in vacuo* auf ein Volumen von ca. 2 ml konzentriert und nochmals bei einer Temperatur von  $5^\circ\text{C}$  für 15 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Nach Abtrennung des Überstandes und Vereinigung der Pellets wurde das 2,4-Dinitrophenylhydrazon noch zweimal mit je 10 ml destilliertem Wasser gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Danach wurde das 2,4-Dinitrophenylhydrazon in 1 ml  $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 99 : 1$  aufgenommen, und 20  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden im  $\text{ESI}^+$ -Triple-Quadrupol-MS analysiert.

#### Spaltung von Helioferin mit Pronase [modifiziert nach SMITH, 1967]:

1 ml einer Enzymlösung in Phosphatpuffer pH 7,0 – 7,2 wurde mit 1 mg Helioferin für 24 h im Brutschrank bei  $40^\circ\text{C}$  inkubiert, und danach wurde das Enzym durch Zugabe eines Überschusses an absolutem Ethanol ausgefällt. Der Überstand wurde abpipettiert, filtriert und *in vacuo* zur Trockne eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde in 1 ml  $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 99 : 1$  aufgenommen, und 20  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden im  $\text{ESI}^+$ -Triple-Quadrupol-MS analysiert.

#### UV/VIS-Spektrometrie:

Spektralphotometer DU 640 (Beckman)

#### IR-Spektrometrie:

IR-Spektrometer IR-470 (Shimadzu). Die Probe wurde in einem KBr-Peßling vermessen.



Dünnschichtchromatographie:

Fertigfolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,25 mm (Merck)

Photodiodearray-HPLC (DAD-HPLC):

Detektor SPD-M10A, Systemkontrolleinheit SCL-10A, Steuerung über CLASS LC-10-Software (Shimadzu)

Säule (analytisch): (125 x 4,6) mm, Nucleosil 120, C<sub>18</sub>, 5 µm, mit integrierter Vorsäule (20 x 4,6) mm, Nucleosil 100, C<sub>18</sub>, 5 µm (GROM)

Säule (semipräparativ): (150 x 8) mm, Nucleosil 120, C<sub>18</sub>, 5 µm, mit integrierter Vorsäule (20 x 4,6) mm, Nucleosil 100, C<sub>18</sub>, 5 µm (GROM)

Eluent A: 0,1% TFA in Wasser

Eluent B: MeCN

Flußrate: 2 ml/min

Zeit [min]	% Eluent A	% Eluent B
0	100	0
1	99,5	0,5
16	0,5	99,5
17	0,5	99,5
21	99,5	0,5

Massenspektrometrie:

1. EI- und FAB: Hochauflösendes doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer AMD 402 mit Direkteinlaßsystem, Ionisierspannung: 70 eV (AMD Intectra Harpstedt)  
FAB-Matrix: 3-Nitrobenzylalkohol, Cs-Ionenbeschuß
2. ESI-Triple-Quadrupol-Messungen: VG Quattro mit ESI-Quelle (VG Biotech Altrincham, England), Eluent MeOH/H<sub>2</sub>O = 99 : 1; Flußrate: 15 µl/min, Temperatur 65 °C. Stoßgas für CID-MS/MS-Untersuchungen: Argon.
3. ESI-Ion-Trap-Messungen: Benchtop-Massenspektrometer Finnigan LCQ (Finnigan Bremen). Stoßgas für MS<sup>n</sup>-Messungen: Helium.
4. HRESI-MS: Hochauflösendes doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer Finnigan MAT 95XL (Finnigan Bremen).

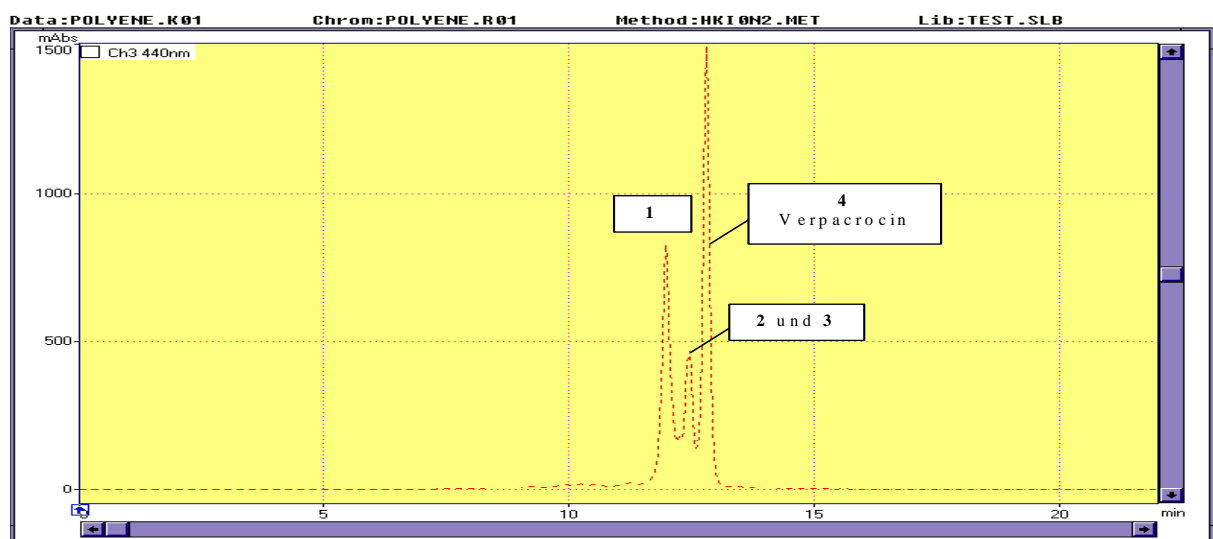
### 3. Ergebnisse:

#### 3.1. Untersuchungen zur Kofermentation von *Verpa digitaliformis* m1046 und *Mycogone cervina* CBS 465.67:

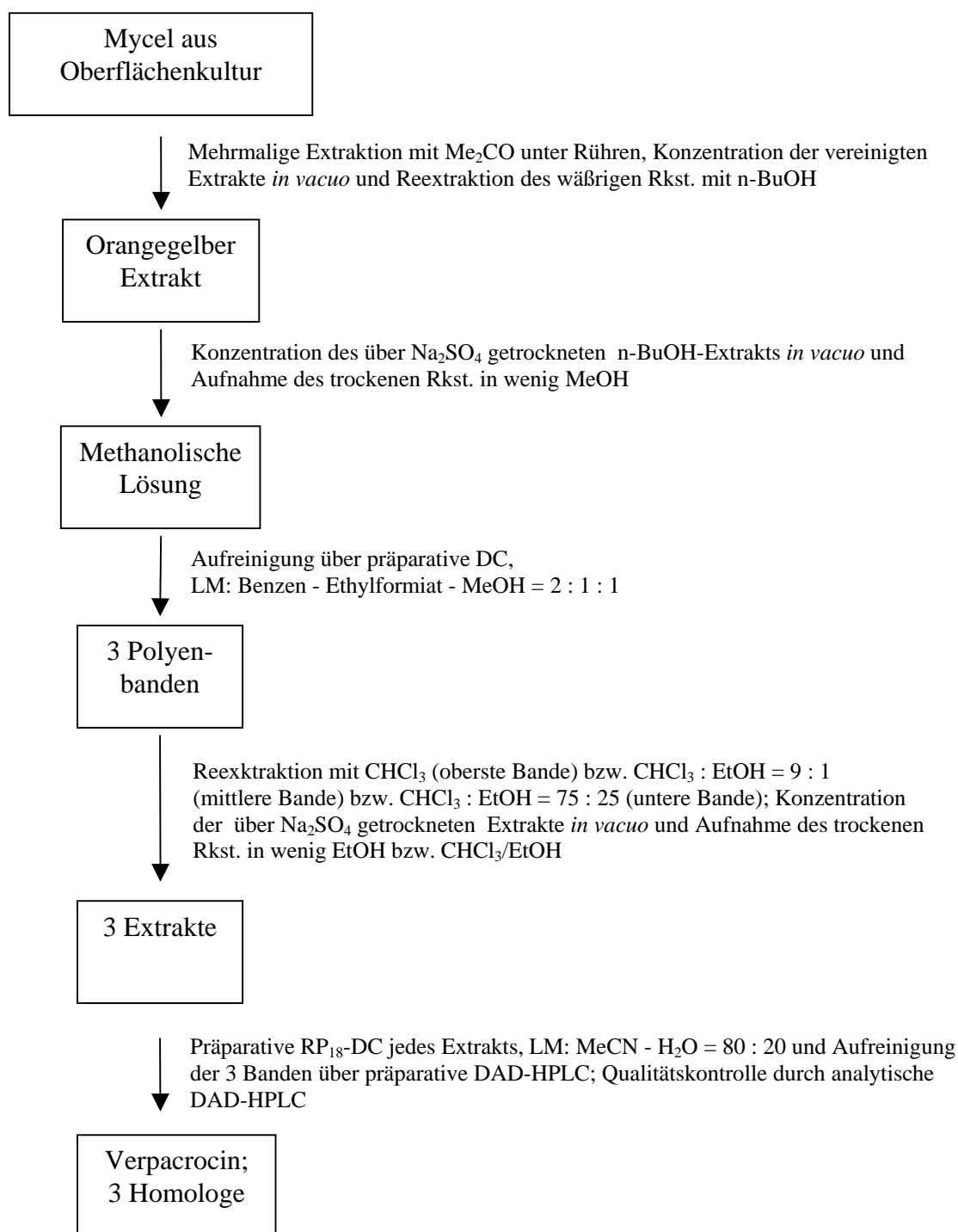
##### 3.1.1. Untersuchungen an Reinkulturen von *Verpa digitaliformis* m1046:

Die Glocken- oder Fingerhutverpel *Verpa digitaliformis* (Pers.)Fr. (Syn.: *V. conica* [Mill.]Swartz ex Pers.) ist als Wirtspilz für *Mycogone cervina* bekannt [GAMS, W.; persönliche Mitteilung 03/1997]. Im Gegensatz zu *Morchella esculenta*, *M. conica*, *M. elata*, *M. semilibera* und *Verpa bohemica* produzieren ihre Mycelkulturen ein leuchtendgelbes Polyen-Pigment [BRESINSKY, 1974], das als Verpacrocin (*all-trans*-2,4,6,8,10,12,14-Hexadecaheptaendial, **Abb. 4**) identifiziert worden und wahrscheinlich mit dem von ARPIN in Fruchtkörperextrakten dieses Ascomyceten gefundenen gelben Pigment identisch ist [BESL *et al.*, 1983].

Bei der Aufarbeitung des Mycels von *Verpa digitaliformis* m1046 aus der Pilzkultursammlung der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurde auf Malz- bzw. Moser-b-Agar sowie bei emerser und submerser Kultivierung auf Malz- und Moser-b-Medium ebenfalls ein leuchtendgelber Extrakt erhalten, der sich in der für Polyene typischen Weise mit konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tiefblau färbte. Zur präparativen Gewinnung dieser Verbindungen wurde der Stamm 21 Tage bei 24°C auf Moser-b-Agar vorkultiviert; die Hauptkultur erfolgte submers auf Moser-b-Flüssigmedium bei 24°C. Die Gewinnung von Polyenen aus dem Mycel des Stammes erfolgte wie in **Abb. 3** dargestellt. Das Kulturfiltrat wurde verworfen.



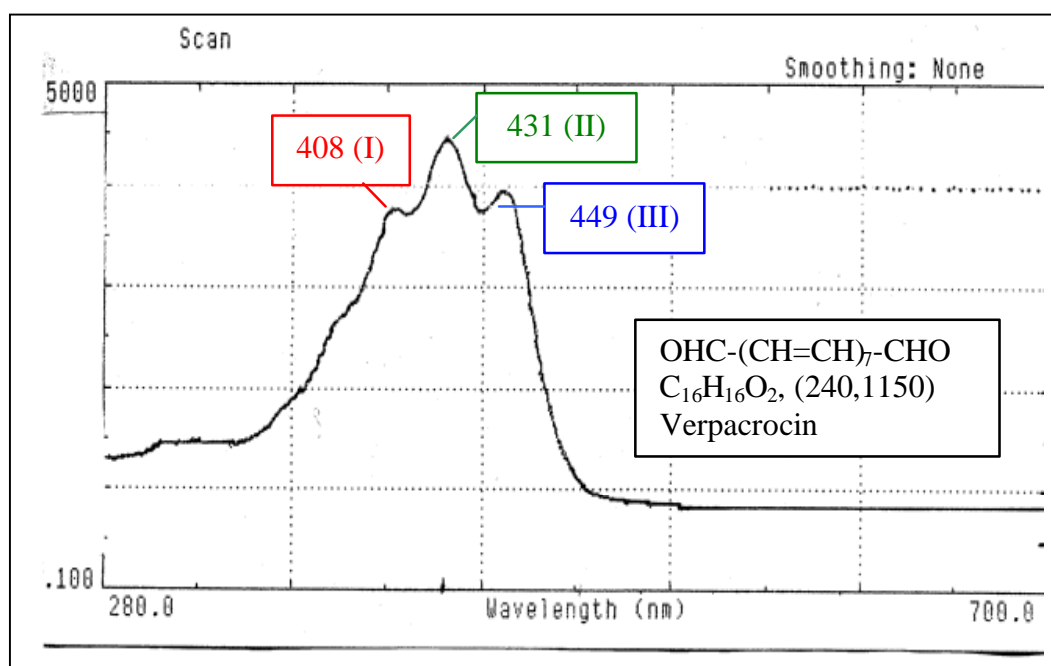
**Abb. 2:** DAD-HPLC-Chromatogramm des Polyen-Gemischs aus *Verpa digitaliformis* m1046



**Abb. 3:** Isolierung der Polyene aus *Verpa digitaliformis* m1046

Aus den UV/VIS-Spektren und der jeweils positiven Reaktion mit konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konnte geschlußfolgert werden, daß die vier Verbindungen eine ähnliche Grundstruktur besitzen. Bei der analytischen Auftrennung des Polyen-Gemischs über DAD-HPLC (Chromatogramm siehe **Abb. 2**; Bedingungen siehe S. 23) wurden folgende Retentionszeiten [min] ermittelt: 12,9 (Polyen 1), 13,3 und 13,4 (Polyen 2 und 3), 13,8 (Polyen 4 = Verpacrocin). Die Retentionszeiten der vier Polyene bei der präparativen DAD-HPLC-Auftrennung sind hierzu um + 1 min verschoben.

Die als Minorkomponenten auftretenden Polyene 1 ( $\lambda_{\text{max.}} = 404 \text{ nm}$ ), 2 und 3 ( $\lambda_{\text{max.}} =$  jeweils  $406 \text{ nm}$ ) waren besser in niederen Alkoholen löslich als das Polyen 4. Letzteres löste sich besser in unpolaren Solventien, wie z. B. Ethylacetat,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  und  $\text{CCl}_4$ , und bildete mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ein Hydrazon. Eine Lösung des Polyens 4 in  $\text{CHCl}_3$  zeigte im UV/VIS-Spektrum, das in **Abb. 4** dargestellt ist, drei charakteristische Absorptionsmaxima bei 408, 431 und 449 nm. Die beiden terminalen Aldehydgruppen wirken hierbei als Auxochrome und bedingen eine bathochrome Verschiebung der für Heptaene angegebenen drei Absorptionsmaxima bei 398 – 408 (I), 376 – 384 (II) und 358 – 365 (III) [THRUM, 1982] um etwa 50 nm.



**Abb. 4:** UV/VIS-Spektrum von Verpacrocin in  $\text{CHCl}_3$

Die mittels EI-MS bestimmte Präzisionsmasse des Polyens 4 beträgt  $m/z$  240,1160 (berechnet  $m/z$  240,1150 für  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2$ ). Diese Daten identifizieren diese Komponente als Verpacrocin.

Über die Strukturen der anderen Polyene konnten jedoch auf Grund ihrer chemischen Instabilität und der geringen zur Verfügung stehenden Probenmenge keine Aussagen getroffen werden.

So wurde die Isolierung und Aufreinigung aller vier Komponenten durch ihre extreme Oxidationsanfälligkeit in Gegenwart von Licht und Sauerstoff erschwert und ließ weitere Aussagen zur Struktur der Polyene 1, 2 und 3 nicht zu. Schon bei Kontakt mit den zur Chromatographie verwendeten Sorbentien, wie Kieselgel bzw. RP<sub>18</sub>-Kieselgel, trat eine merkliche Oxidation ein - während das Polyengemisch bei Konzentration des Rohextrakts *in vacuo* noch in gelborange gefärbten Mikrokristallen ausfiel, wurden im Zuge der weiteren Aufarbeitung massive Verluste der Ausbeuten registriert und ein zunehmend amorpher, gelber bis blaßgelber Rückstand erhalten. Eine Aufbewahrung der polyenhaltigen Extrakte im Dunkeln bei einer Temperatur von 4°C in organischen Lösungsmitteln (MeOH, Me<sub>2</sub>CO) bzw. unter Stickstoff konnte den offensichtlichen Oxidationsprozeß nicht verhindern, sondern lediglich hinauszögern.

### 3.1.2. Untersuchungen an Reinkulturen von *Mycogone cervina* CBS 465.67 und Kofermentation mit *Verpa digitaliformis* m 1046:

*Mycogone cervina* ist als Parasit auf großen Fruchtkörpern verschiedener Helvellaceen bekannt [GAMS, W.; persönliche Mitteilung 03/1997] und wurde unter gleichen Bedingungen wie der von ihr befallene Wirtspilz *Verpa digitaliformis* kultiviert. Die Auswahl des Stammes *Mycogone cervina* CBS 465.67 erfolgte mit dem Ziel der Überprüfung einer Lipoaminopeptid-Bildung, da bekanntermaßen taxonomisch eng verwandte und in ihrer Ökologie sehr ähnliche Species eventuell chemisch ähnliche Sekundärmetabolite produzieren könnten:

So berichteten GRÄFE *et al.* 1995 über zwei stark antifungal wirksame Substanzen, die Helioferine A und B, die aus Reinkulturen von *Mycogone rosea* DSM 8822 isoliert worden waren.

Bei Überprüfung der antibiotischen Aktivität konzentrierter methanolischer Rohextrakte des Mycels und von EtOAc-Extrakten von Kulturfiltraten des Stammes im Lochplatten-Agardiffusionstest (siehe **Tab. 1**) wurde jedoch eine nur sehr schwache Hemmung der Testkeime festgestellt. Die geringe antibiotische Aktivität der Kokulturen ist offenbar auf die von *Verpa digitaliformis* m1046 gebildeten Polyene zurückzuführen.

**Tab. 1:** Antibiotische Aktivität von Extrakten aus Rein- und Kokulturen von *Mycogone cervina* CBS 465.67 mit *Verpa digitaliformis* m 1046 nach dreiwöchiger Submerskultur

Testkeim	Hemmhof-Durchmesser [mm]					
	Reinkultur CBS 465.67		Reinkultur m 1046		Kokultur CBS 465.67/m1046	
	Mycel	Kulturfiltrat	Mycel	Kulturfiltrat	Mycel	Kulturfiltrat
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12	14	14	0	15	18
<i>Staphylococcus aureus</i> SG 511	14	14	14	0	17	16
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> SBUG 549	0	0	18	0	17	14
<i>Penicillium notatum</i> JP 36	0	A*	19	0	18	14 p
<i>Mycobacterium smegmatis</i> SG 987	12	12	17	0	14	Ap*

\*p – partielle Hemmung

A - nicht meßbare Andeutung einer Hemmung

Aus Reinkulturen von *Mycogone cervina* CBS 465.67 konnten Leitmetabolite weder massenspektrometrisch detektiert, noch extrahiert werden. Eine Erhöhung der Kulturdauer auf sechs, neun bzw. zwölf Wochen erbrachte im Vergleich zu einer drei Wochen alten Kultur keine Unterschiede. Das Fehlen isolier- und charakterisierfähiger Leitmetabolite von *Mycogone cervina* CBS 465.67 und die extreme Instabilität der Polyene aus *Verpa digitaliformis* m1046 führten zur Einstellung der weiteren Bearbeitung dieser Wirt-Mykoparasit-Kombination und gaben Anlaß zur Untersuchung eines weiteren Mykoparasiten der Gattung *Mycogone*, *M. rosea* DSM 12973, als Kofermentationspartner.

### 3.2. Untersuchungen zur Kofermentation von *Macrolepiota procera* F050 und *Mycogone rosea* DSM 12973:

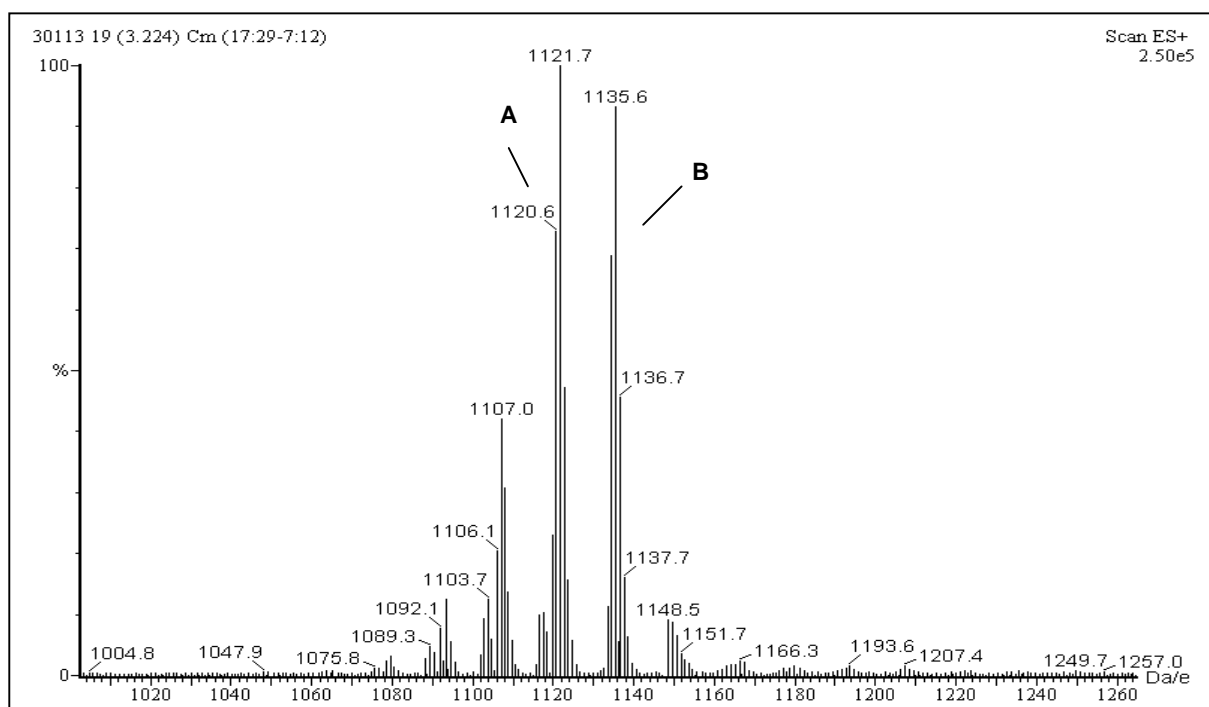
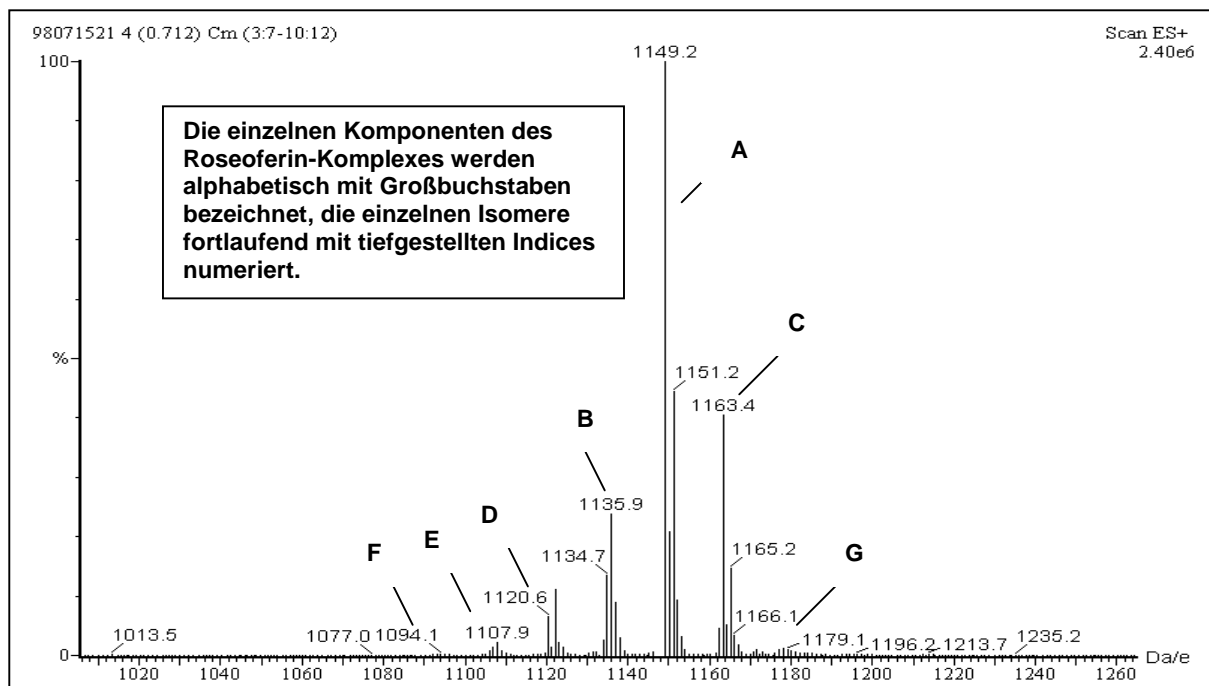
#### 3.2.1. Untersuchungen an Reinkulturen von *Mycogone rosea* DSM 12973:

##### 3.2.1.1. Auswahl des Stammes und erste Untersuchungen zur Struktur der produzierten Antibiotika:

In einem Vorscreening zur Auswahl weiterer geeigneter Mykoparasiten wurde gefunden, daß Rohextrakte von Kulturen des Stammes *Mycogone rosea* Link DSM 12973 eine starke Hemmung von grampositiven Bakterien und Vertretern der Gattung *Mycobacterium* verursachen. Außerdem wurden filamentöse Pilze und Hefen, einschließlich der humanpathogenen Hefe *Candida albicans*, erfaßt. Die getesteten Gramnegativen erwiesen sich hingegen als unempfindlich. Das antibiotische Wirkungsspektrum entsprach somit qualitativ dem der Helioferine A und B aus *Mycogone rosea* DSM 8822 [GRÄFE *et al.*, 1995].

Wie die Pamamycine aus *Streptomyces aurantiacus*, zeichnen sich die Helioferine durch die charakteristische Eigenschaft des „Phasentransfers“ aus [STENGEL *et al.*, 1992]. D. h., saure hydrophile Anionen, wie z.B. Helianthat (Methylorange), werden aus gepufferter wäßriger Lösung (pH 6,0) in eine Toluol-Phase infolge der Bildung lipophiler Ionenpaare überführt. Diese Eigenschaft ist auf die Anwesenheit von sekundären oder tertiären Aminogruppen im Molekül zurückzuführen, die hydrophile organische Säuren unter Salzbildung binden [GRIGORIEV *et al.*, 1996]. Mit dieser Methode ist eine sehr einfache Detektion selbst kleinster Mengen basischer, Ionenpaar-bildender lipophiler Antibiotika in Rohextrakten bzw. in den während der Aufarbeitung anfallenden Fraktionen (siehe **Abb. 7**) möglich.

Da methanolische Extrakte des Mycels bzw. EtOAc-Extrakte des Kulturfiltrats von *Mycogone rosea* DSM 12973 im o.g. Zweiphasen-Transfertest eine stark positive Reaktion ergaben, wurde dieser Stamm für die spezielle Bearbeitung ausgewählt. Das ESI<sup>+</sup>-MS der Testprobe (siehe **Abb. 5, oben**) ließ auf Grund der Molmassen der sieben intensivitätsstärksten [M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ionen vermuten, daß *Mycogone rosea* DSM 12973 Vertreter der Lipoaminopeptide vom Typ der Helioferine (siehe **Abb. 5, unten**) produziert. Wegen der Bildung dieser phasentransferaktiven Komponenten durch *Mycogone rosea* DSM 12973 wurden die neuen Verbindungen als „Roseoferine“ bezeichnet.

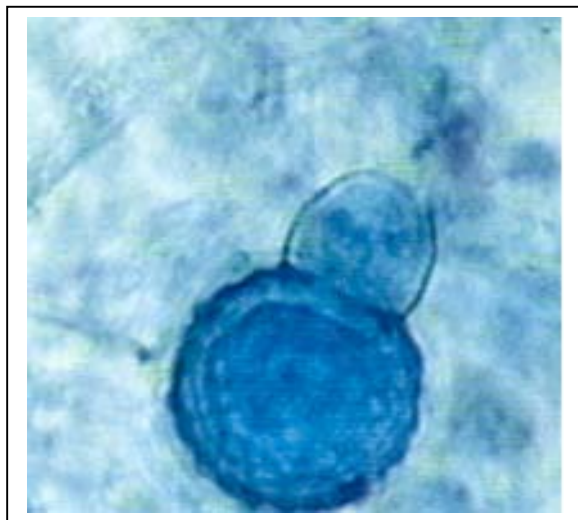


**Abb. 5:** ESI<sup>+</sup>-Triple-Quadrupol-Massenspektrum der Heliogerine aus *Mycogone rosea* DSM 8822 (**unten**) und der Roseoferine aus *Mycogone rosea* DSM 12973 (**oben**)



### 3.2.1.2. Stammbeschreibung von *Mycogone rosea* DSM 12973:

Der Stamm *Mycogone rosea* DSM 12973 aus der Stammsammlung des HKI Jena entwickelt auf Malzagar, jedoch auch auf chemisch definierten Medien, wie MSA oder Wb 6-1/14, ein reich septiertes weißes Mycel. Das Naphthochinon Bikaverin, welches bei einem Teil der in der Literatur beschriebenen Stämme von *Mycogone rosea* eine charakteristische Rotfärbung von Mycel und Agarmedium verursacht [TERASHIMA, 1972; HELFER, 1991], konnte nicht nachgewiesen werden. Der Durchmesser der hyalinen Hyphen beträgt 5 bis 7 µm. Die typischen, am Luftmycel gebildeten Chlamydosporen (Aleuriokonidien, siehe **Abb. 6**) sind zweizellig: die mit Warzen besetzte Terminalzelle mißt (17,1 x 17,9) µm; die halbkugelig erscheinende Basalzelle ist (9,0 x 11,3) µm groß. Die Gesamtlänge der Chlamydospore beträgt somit 26,1 µm. Die als fakultativ beschriebene Bildung verticillater Konidienträger, an denen sich einzellige Phialokonidien entwickeln [BARNETT & HUNTER, 1987; HAWKSWORTH; 1981], wurde nicht beobachtet. Eine Kultur des Stammes riecht typisch, durchdringend aromatisch; der Geruch erinnert an Naphthalin.

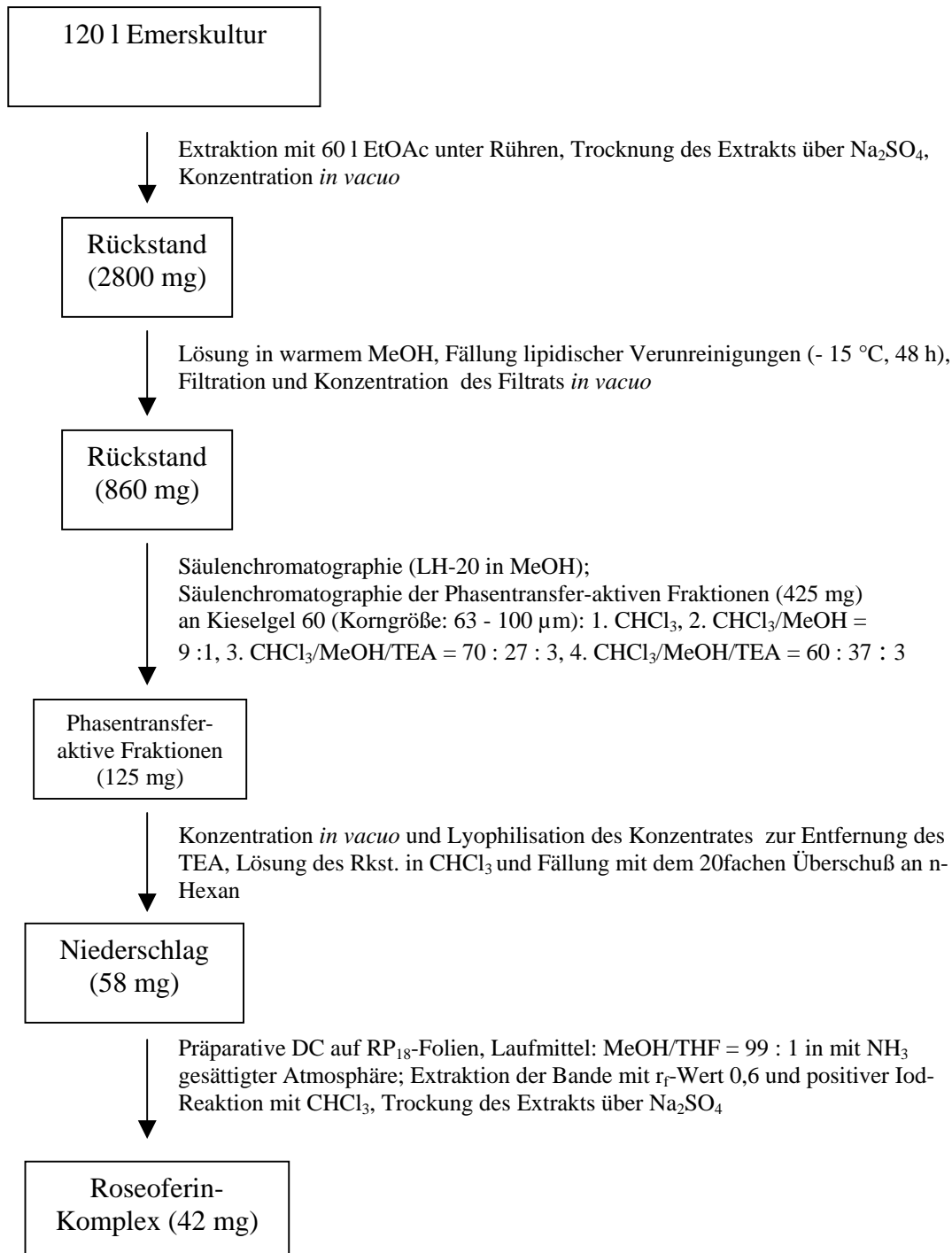


**Abb. 6:** Eine Chlamydospore von *Mycogone rosea* DSM 12973, gefärbt mit Milchsäure-Baumwollblau (Phasenkontrast, x 400)

### 3.2.1.3. Kultivierung des Stammes und präparative Isolierung des Roseoferin-Komplexes:

Die erste und zweite Vorkultur von *Mycogone rosea* DSM 12973 erfolgten auf Petrischalen mit Malzagar für jeweils 14 Tage bei 24°C. Die Hauptkultur wurde in 1 l-Erlenmeyer-Kolben,

enthaltend je 250 ml Malzmedium, durchgeführt. Dem Medium wurde zur Erhöhung der Ausbeute an Roseoferin 4 g/l Agar-Agar zugesetzt. Die Kultivierung wurde bei einer Temperatur von 24°C über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt und danach das halbflüssige Medium, wie in **Abb. 7** dargestellt, direkt extrahiert.



**Abb. 7:** Isolierung des Roseoferin-Komplexes aus *Mycogone rosea* DSM 12973

Mit den sauren oder neutralen Eluentensystemen, die zur Gewinnung der Polyene aus *Verpa digitaliformis* m1046 verwendet worden, war der Roseoferin-Komplex nicht eluierbar. Das für die Trennung der Helioferine A und B angegebene isokratische HPLC-System [GRÄFE *et al.*, 1995] MeCN : H<sub>2</sub>O : TEA = 83 : 17 : 1 und das System MeOH : THF = 99 : 1 führten zu keiner wirklichen Trennung der Einzelkomponenten des Roseoferin-Komplexes. Ebenfalls erfolglos blieben Versuche mit basischen Gradientenelutionssystemen.

Falls eine HPLC-Trennung der acht massenspektrometrisch detektierbaren Quasi-Molekül-Ionen des Roseoferin-Komplexes möglich gewesen wäre, hätten dennoch keine Reinsubstanzen isoliert werden können, da jedem einzelnen Quasi-Molekül-Ionen-Peak wiederum ein Gemisch von positionsisomeren Strukturen zugeschrieben werden mußte (siehe Abschnitt 3.2.1.6.1.).

#### 3.2.1.4. Physikochemische Eigenschaften des Roseoferin-Komplexes:

**Tab. 2:** Physikochemische Eigenschaften des Roseoferin-Komplexes

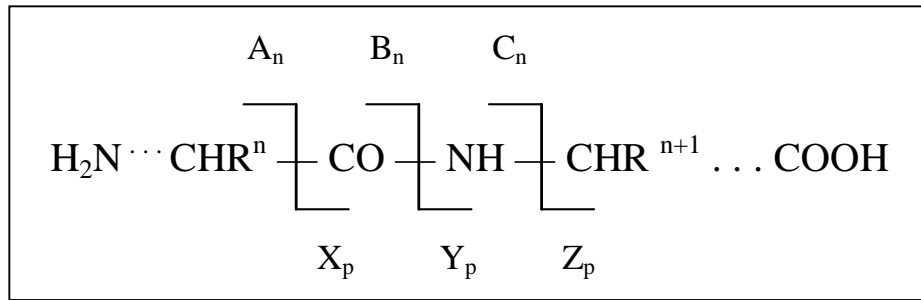
	Helioferin	Roseoferin-Komplex
Erscheinungsbild	Fabloses, mikrokristallines Pulver	Leicht bräunliches, mikrokristallines Pulver
Löslichkeit (löslich/unlöslich)	Niedere Alkohole, Me <sub>2</sub> CO, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , CHCl <sub>3</sub> , Benzen, Toluol, MeCN/Petrolether, n-Hexan, H <sub>2</sub> O	
R <sub>f</sub> -Wert (LM)	0,6 (MeOH/THF = 99 : 1 in mit NH <sub>3</sub> gesättigter Atmosphäre)	
UV	② <sub>max.</sub> 280 nm (CO-NH)	
Reaktion mit:		
- Ninhydrin	Sehr schwach positiv (rosa)	Negativ
- DRAGENDORFFs Reagens	Negativ	Negativ
- KILLANDERs Biuret-Reagens	Positiv	Positiv
- Iod-Dämpfen	Positiv	Positiv
- Vanillin-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwach positiv	Schwach positiv
IR (in KBr):	3405 (br, st), 2960 (m), 1661 (sst), 1532 (st), 1456 (br), 1381, 1288 (br), 1250, 1219, 1189, 1126, 1098, 1074, 1043, 646, 622	3315 (br, st), 2925 (m), 1661 (sst), 1533 (br), 1461 (br), 1383, 1288, (br), 1197 (d), 1129, 640, 619

Der Roseoferin-Komplex reagierte weder mit Ninhydrin, noch mit DRAGENDORFFs Reagens, so daß die Anwesenheit freier Aminogruppen oder primärer Amin-Funktionen im Molekül ausgeschlossen werden konnte. Ein erster Hinweis auf eine peptidische Natur des Roseoferin-Komplexes ergab sich aus der positiven Reaktion mit KILLANDERs Biuret-Reagens. Eine als Kontrolle geprüfte Helioferin-Lösung zeigte ebenfalls eine deutliche violette Verfärbung. Die Reaktion mit Vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> war uncharakteristisch; nur bei Applikation konzentrierter Lösungen entstand auf dem Chromatogramm eine schwach bräunliche Verfärbung, die jedoch sehr schnell ausblühte. Die beste Möglichkeit zur Detektion des Roseoferins im DC bestand in der Visualisierung der Bande mit Iod-Dämpfen; hierbei kam es zu einer sofortigen charakteristischen sattgelben Verfärbung.

Ein weiterer Beweis für eine peptidische Struktur der Roseoferine wurde durch das Auftreten der diagnostischen IR-Banden bei folgenden Wellenzahlen erbracht [in cm<sup>-1</sup>]: 3315, 2925 ( $\oplus_{\text{NH}}$  und  $\oplus_{\text{OH}}$  Amin/Amid), 1661 (Amid I) und 1532 (Amid II). Die große Ähnlichkeit der IR-Spektren (siehe **Tab. 2**) ließ starke Strukturhomologien beider Antibiotika vermuten.

### 3.2.1.5. Allgemeine Bemerkungen zur massenspektrometrischen Strukturanalytik von Peptiden:

Die Bestimmung der Aminosäuresequenz von Peptiden mit einem Molekulargewicht unter 2.000 ist durch verschiedene Methoden der klassischen Massenspektrometrie und der Tandem-Massenspektrometrie möglich. Bei Hochenergie-Ionisation (EI- und FAB-MS) werden zusätzlich zu den [M+H]<sup>+</sup>- und [M+Na]<sup>+</sup>-Ionen zahlreiche Fragment-Ionen beobachtet. Nach ROEPSTORFF *et al.* [1985] werden unter diesen Bedingungen maximal sechs Serien von Fragment-Ionen generiert, entsprechend C-Heteroatom- und  $\alpha$ -Spaltungen peptidischer Bindungen. Verbleibt die Ladung bei der Spaltung am N-terminalen Fragment so werden die entsprechenden Fragmente als A-, B- bzw. C-Typ klassifiziert; verbleibt sie hingegen am C-Terminus, werden die entstehenden Fragmente entsprechend mit X, Y und Z bezeichnet. Ist der Bindungsbruch von einer Wasserstoff-Übertragung begleitet, wird jedes übertragene Atom durch einen Strich symbolisiert – befindet sich dieser auf der linken Seite, bedeutet dies einen Verlust; auf der rechten Seite hingegen ein zusätzliches Atom (**Abb. 8**).



**Abb. 8:** Nomenklatur bei der Peptidfragmentierung [nach ROEPSTORFF *et al.*, 1985]

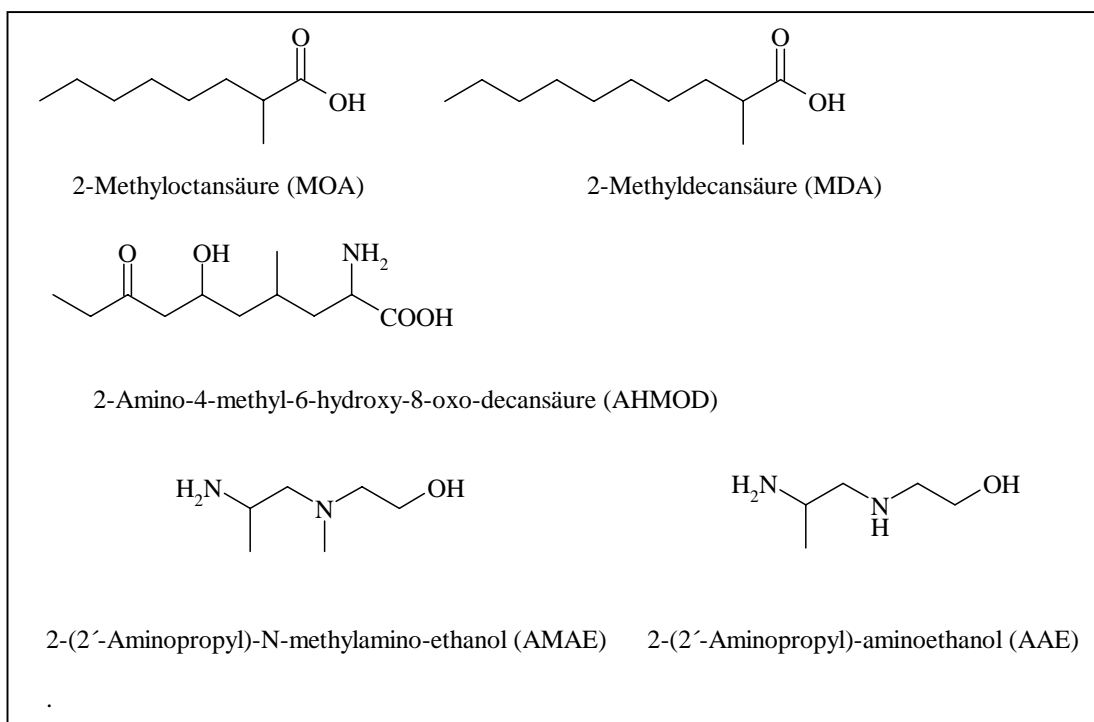
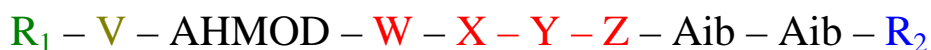
Durch das Auftreten mehrerer zusätzlicher Serien von Fragment-Ionen wird die Auswertung solcher Massenspektren von Peptiden und somit die Peptidsequenzierung häufig erschwert. Bei der Elektrospray-Ionisation entstehen zumeist keine Fragmente, sondern nur die Quasi-Molekül-Ionen. Diese können im Massenanalysator separiert und einzeln durch Stoßaktivierung mit Argon oder Helium in Kollisionszellen (CID-MS/MS, CID-MS<sup>n</sup>) einer Niederenergie-Fragmentierung unterworfen werden. Im positiven Ionenmodus werden bei der nachfolgenden Analyse im zweiten Massenanalysator bzw. der Ionenfalle vor allem B-Typ-Fragmente nachgewiesen, d. h., die Spaltung der Peptidbindung erfolgt unter Ladungsverbleib am N-Terminus. Dadurch ist eine präzise Zuordnung der Fragmente zu einem bestimmten Quasi-Molekül-Ion häufig leichter möglich als bei FAB-MS. Von Nachteil ist jedoch, daß im CID-MS/MS nur ein Teil größerer Peptide durch Fragment-Ionen charakterisiert werden kann, während FAB-MS sämtliche Fragmente liefert. Die Möglichkeit der Erzeugung weiterer Generationen von Tochterionen (MS<sup>n</sup>) mit Ionenfallen-Analysatoren gestattet ferner den Nachweis und die Sequenzierung positionsisomerer Peptide (siehe unten). In der Ionenfalle werden die Ionen nicht wie in einem Quadrupol-Analysator über eine bestimmte Strecke transportiert, sondern beschreiben eine zeitlang stabile Kreisbahnen in einem hochfrequenten Wechselstromfeld, das um eine Ringelektrode herum anliegt. Durch Variation der Amplitude der angelegten Wechselspannung kann eine selektive Massenbestimmung ausgewählter Ionen vorgenommen werden, die dadurch nach und nach zum Verlassen der Kreisbahnen angeregt werden. Der Vorteil einer solchen Ionenfalle besteht darin, daß die Genealogie der Tochterionen Schritt für Schritt analysiert werden kann. Beispielsweise kann jedes der durch Kollision mit Helium entstehenden MS<sup>2</sup>-Tochterionen separat fragmentiert werden, so daß es zur Entstehung von MS<sup>3</sup>-Enkelionen kommt, durch deren weitere Fragmentierung MS<sup>4</sup>-Urenkelionen generiert werden usw. In Abhängigkeit von der Intensität des Mutter-Ions, können auf diese Weise bis zu maximal zehn Generationen von

Tochterionen analysiert werden [LEHMANN, 1996; LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998; HEINZE *et al.*, 1998; GRÄFE *et al.*, 2000 (a) und (b)].

3.2.1.6. Strukturaufklärung des Roseoferin-Komplexes durch massenspektrometrische Untersuchungen:

3.2.1.6.1. ESI<sup>+</sup>-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS- und ESI<sup>+</sup>-Ion-Trap-MS<sup>n</sup>-Untersuchungen der homologen Quasi-Molekül-Ionen:

Die Strukturformeln der Bausteine sowie die allgemeine Formel der insgesamt 27 Antibiotika des Roseoferin/Helioferin-Komplexes sind in **Abb. 9** dargestellt. Die farbig hervorgehobenen Reste stellen hierbei die variablen Teile des Moleküls dar (siehe **Tab. 4 und 17**).



**Abb. 9:** Allgemeines Schema und Strukturen ausgewählter Bausteine der Antibiotika des Roseoferin-Helioferin-Komplexes

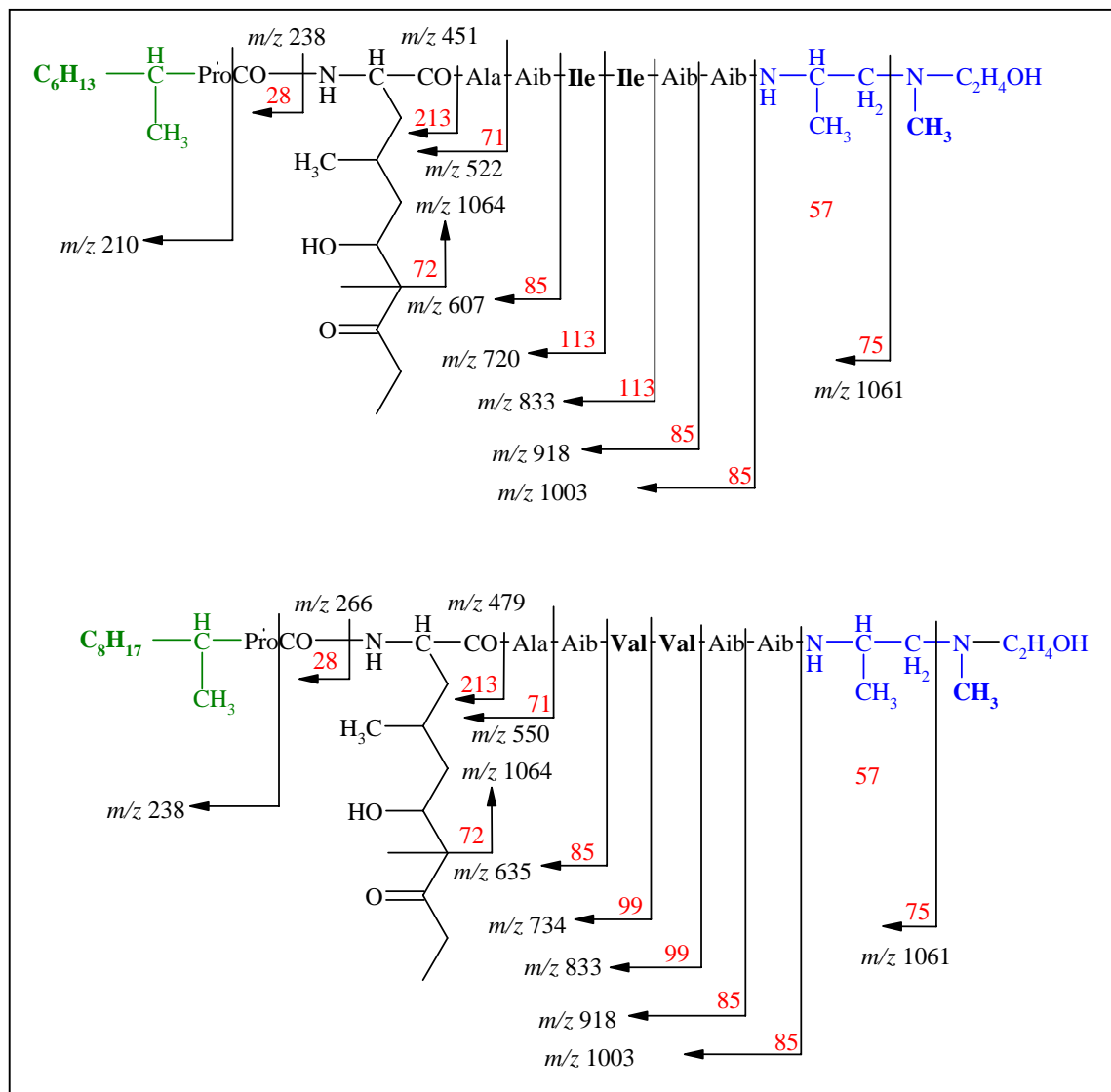
R<sub>1</sub> ist jeweils der Säurerest einer  $\alpha$ -methylverzweigten Fettsäure - entweder 2-Methyloctan- (MOA) bzw. 2-Methyldecansäure (MDA). Den Rest R<sub>2</sub> bildet ein Aminoalkohol, d. h.

entweder 2-(2'-Aminopropyl)-N-methylamino-ethanol (AMAE) oder 2-(2'-Aminopropyl)-aminoethanol (AAE). Bei dem Rest V handelt es sich entweder um L-Prolin oder L-4-Hydroxyprolin. Letzteres wird bei Fütterung zweier definierter N-Quellen,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und L-4-Hydroxyprolin, anstelle des ersteren eingebaut (siehe Abschnitt 3.2.1.8.4.). Rest W ist ~~α~~-Aminoisobuttersäure (Aib) oder L-Alanin. Der Rest X ist Aib oder L-Valin, und die Reste Y und Z werden jeweils durch ein L-Isoleucin oder L-Valin besetzt. Die schwarz gezeichneten Teile des Moleküls stellen die strukturell konservativen Regionen des Moleküls in den Positionen 3, 8 und 9 dar, welche offenbar für die biologische Aktivität essentiell sind und daher invariabel bleiben.

Das  $\text{ESI}^+$ -MS des Helioferin-Gemischs (A : B im Verhältnis 3 : 7, siehe **Abb. 5, unten**) zeigt die intensitätsstarken Quasi-Molekül-Ionen dieser Komponenten bei  $m/z$  1122 bzw. 1136 [GRÄFE *et al.*, 1995] sowie weitere, intensitätsschwächere Quasi-Molekül-Ionen mit  $m/z$  1078, 1094, 1108, 1150 und 1164. Die Massendifferenz von 14 amu entspricht dem Auftreten von Homologen mit fehlenden bzw. zusätzlichen  $\text{CH}_2$ -Gruppen [HESSE *et al.*, 1995]. Die Anwesenheit einer tertiären Aminogruppe verleiht den Helioferinen stark basische Eigenschaften, so daß diese Verbindungen leicht protonieren und somit durch das Auftreten sehr intensiver  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasi-Molekül-Ionen im positiven Modus des ESI-MS gut detektierbar sind. Das Gleiche gilt auch für die im antibiotisch aktiven Rohextrakt aus *Mycogone rosea* DSM 12973 nachzuweisenden Komponenten (siehe **Abb. 5, oben**): Insgesamt wurden sieben  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasi-Molekül-Ionen ( $m/z$  1178, 1164, 1150, 1136, 1122, 1108 und 1094 beobachtet), wobei die Hauptkomponenten im Vergleich zum Helioferin B ( $m/z$  1136) eine um 14 bzw. 28 amu höhere Masse aufweisen.

Zur Analyse des Roseoferin-Komplexes wurde ein  $\text{ESI}^+$ -Triple-Quadrupol-CID-MS/MS-Spektrum der Quasi-Molekül-Ionen der Roseoferine bei  $m/z$  1136, 1150 und 1164 registriert. Als Referenzsubstanz wurde Helioferin B im CID-MS/MS-Spektrum gemessen. Beide Spektren sind in **Abb. 11** dargestellt:

Bei der Fragmentierung des  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions  $m/z$  1136 des Helioferins B (siehe **Abb. 11, oben**) entstehen die dominanten diagnostischen B-Typ-Fragmente  $\text{B}_1$  bis  $\text{B}_7$ . Das diagnostische  $\text{B}_1$ -Fragment des (MOA+Pro)-Ions bei  $m/z$  238 wird von einem  $\text{A}_1$ -Fragment-Ion bei  $m/z$  210 begleitet. Aus der Massendifferenz der einzelnen B-Typ-Fragmente ist somit die gesamte Sequenz der Verbindung ablesbar [GRÄFE *et al.*, 1995]. Das in **Abb. 11 unten** dargestellte CID-MS/MS-Spektrum des Roseoferin-Quasi-Molekül-Ions bei  $m/z$  1136 ist – wider Erwarten – nicht mit dem des Helioferins B identisch.

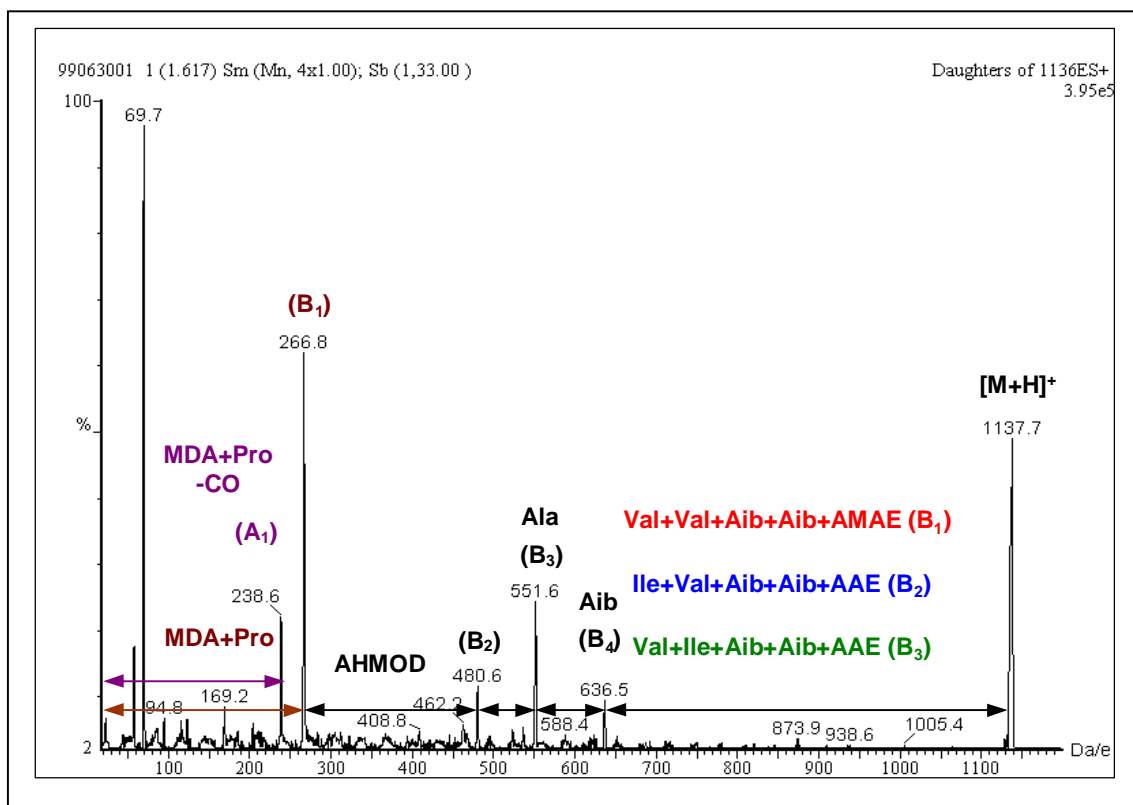
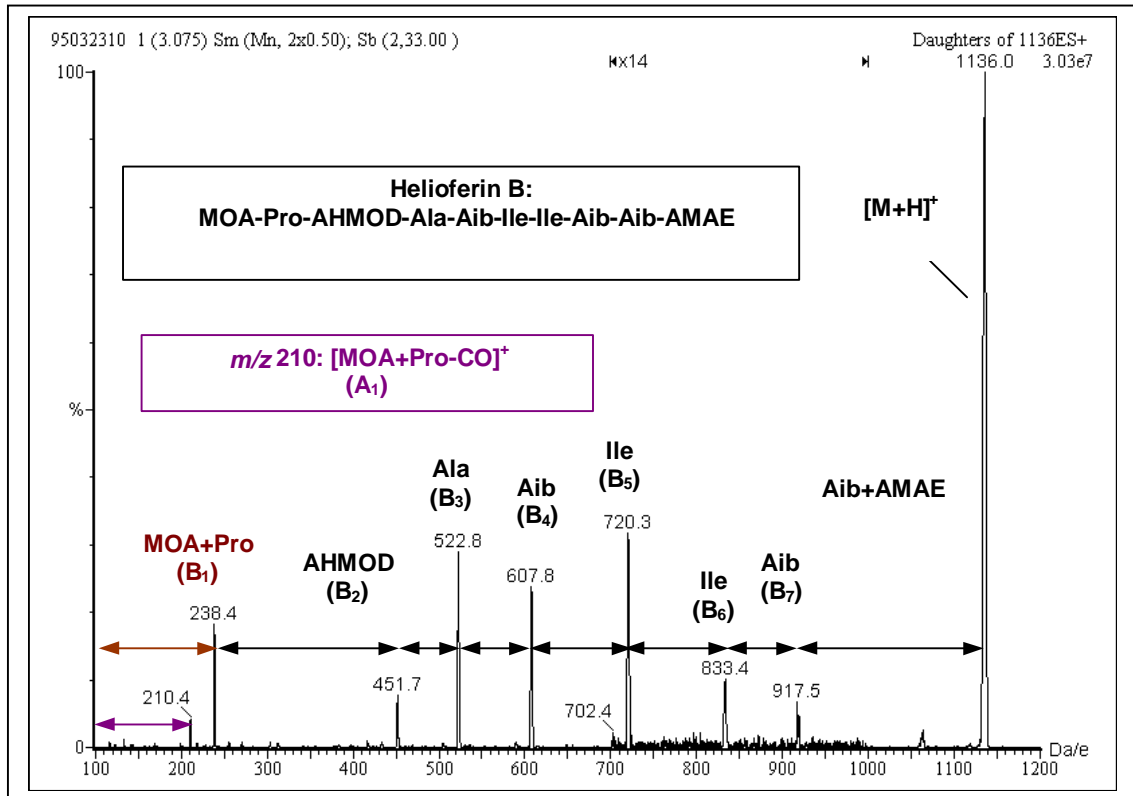


**Abb 10.:** Fragmentierung von Helioferin B (**oben**) und Roseoferin B<sub>1</sub> (**unten**) im ESI<sup>+</sup>-MS

Die Fettsäure-Reste sind grün, die AMAE-Reste blau und die Massendifferenzen der diagnostischen Fragment-Ionen rot dargestellt. Die sich unterscheidenden Reste sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Es fällt auf, daß die entstehenden Fragment-Ionen um eine Massendifferenz von 28 amu gegenüber denen des Helioferins B verschoben sind. Die CID-MS/MS-Fragmente B<sub>1</sub> bis B<sub>4</sub> erwiesen sich in fünf der sieben Quasi-Molekül-Ionen des Roseoferin-Komplexes als identisch, während die Quasi-Molekül-Ionen bei  $m/z$  1107 und 1094 eine den Helioferinen entsprechende Fragmentierung zeigten. Daraus folgt, daß *Mycogone rosea* DSM 12973 neue Lipoaminopeptid-Antibiotika produziert. Die Isomerie bzw. Homologie der Roseo- und Helioferine konnte auf Grund der Fragmentierung lokalisiert werden. Sie befindet sich entweder in den Positionen 1 oder 2 der Peptidkette, d.h. im Fettsäure- oder im Prolin-Rest.





**Abb. 11:** ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS von Helioferin B (**oben**) und Roseoferin B (**unten**):

Im Falle des Roseoferins mit  $[M+H]^+$  1136 sind auf Grund von ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS-Untersuchungen (**unten**) drei MDA-haltige Positionsisomere B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub> postuliert worden, deren Existenz durch das Auftreten mehrerer Reihen diagnostischer ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup>-Ionen (siehe **Abb. 12**) bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu, produziert *Mycogone rosea* DSM 8822 (**oben**) keine Positionsisomere mit  $m/z$  1136.

Die Differenzen zwischen den übrigen B-Typ-Fragmenten lassen eine Identität mit den korrespondierenden Helioferin-Fragmenten vermuten.

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Fragmente wurde die ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup> (siehe oben) als Methode der Wahl angewandt:

Dabei waren die Fragmente B<sub>2</sub> bis B<sub>8</sub> der Helio- und Roseoferine detektierbar (siehe **Abb. 12**). Die Position der Säurereste der AHMOD, des ersten Ala und der ersten Aib in der Peptidkette konnten durch beide MS-Methoden bestätigt werden.

Bei der Fragmentierung des [M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ions des Helioferins B im MS<sup>2</sup>-Spektrum wurde nur eine Serie von Tochterionen gebildet, so daß die resultierende Sequenz der B-Typ-Spaltungen der des in **Abb. 11 (oben)** gezeigten ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS entspricht. Daher ist die Existenz von Positionsisomeren in diesem Falle auszuschließen.

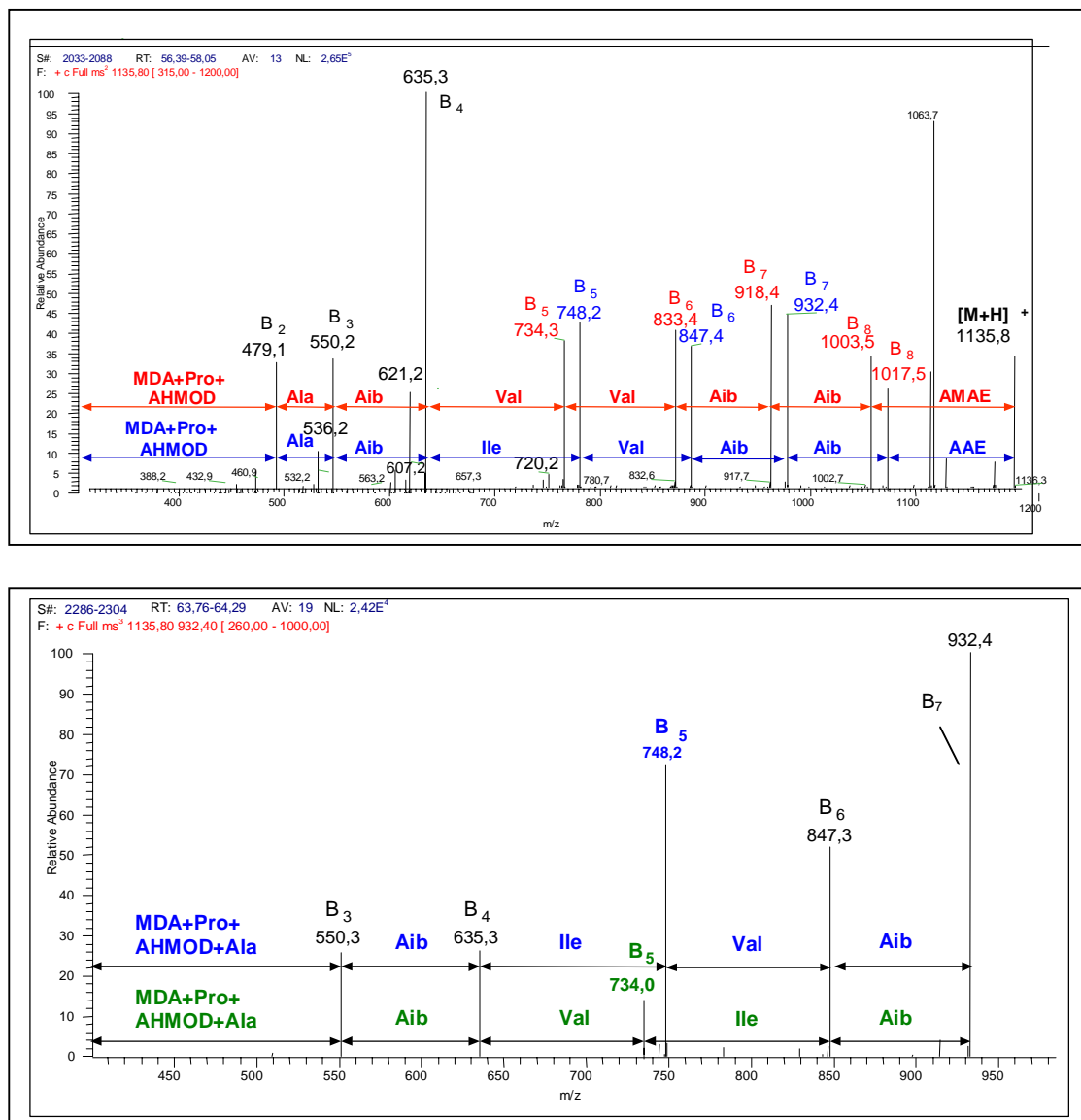
Im Gegensatz dazu, bestätigten CID-MS<sup>n</sup>/MS-Untersuchungen der homologen Quasi-Molekül-Ionen des Roseoferin-Komplexes bei *m/z* 1178, 1164, 1150, 1136, 1122, 1108 und 1094, daß ein Isomerengemisch, das aus Verbindungen gleicher Molmasse mit verschiedenen Aminosäuresequenzen besteht, vorliegt. Ein typisches Beispiel zur Illustration des allgemeinen analytischen Vorgehens zur Fragmentierungsanalyse der Roseoferine ist in **Abb. 12 (oben)**, anhand des ESI-Ion-Trap-CID-MS<sup>2</sup> des [M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ions bei *m/z* 1136, dargestellt.

Die Partialsequenzen der B-Typ-Fragmente B<sub>2</sub> bis B<sub>8</sub> der Roseoferine B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> sind direkt aus dem Spektrum ablesbar. Den N-Terminus aller Roseoferine bildet – wie im Falle der Helioferine – entweder ein AMAE-Rest, erkennbar am Vorhandensein eines diagnostischen Fragment-Ions bei *m/z* [M+H]<sup>+</sup> - 133 Da; hier: *m/z* 1003,5; oder ein AAE-Rest bei [M+H]<sup>+</sup> - 119 Da; hier: *m/z* 1017,5. Die Sequenz des Roseoferins B<sub>2</sub> gibt Anlaß zu der Vermutung der Existenz eines weiteren Positionsisomers, bei dem die Säurereste des Isoleucins und Valins in Position 6 und 7 der Peptidkette vertauscht sein könnten.

Die Aminosäure-Sequenz der jeweiligen Isomeren (siehe **Tab. 4**) wurde durch CID-MS<sup>3</sup> - Stoßexperimente verschiedener CID-MS<sup>2</sup> -Tochterionen bestimmt; denn jedes der im MS<sup>2</sup> erhaltenen Fragment-Ionen diente als Quelle weiterer B-Typ-Spaltungen. Die Strukturermittlung des Roseoferins B<sub>2</sub> mittels ESI-Ion-Trap-CID-MS<sup>3</sup> ist in **Abb. 12 (unten)** dargestellt:

Die Fragmentierung des MS<sup>2</sup>-Tochterions bei *m/z* 932,4 lieferte zwei Serien von MS<sup>3</sup>-Enkelionen. Das Auftreten des diagnostischen Fragment-Ions B<sub>5</sub> mit *m/z* 734,0 neben dem

Fragment-Ion  $B_5$  mit  $m/z$  748,0 des Roseoferins  $B_2$  bestätigte somit die Existenz des vermuteten Positionsisomers Roseoferin  $B_3$ .



**Abb. 12:** ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Roseoferin B-Quasi-Molekül-Ions (**oben**)

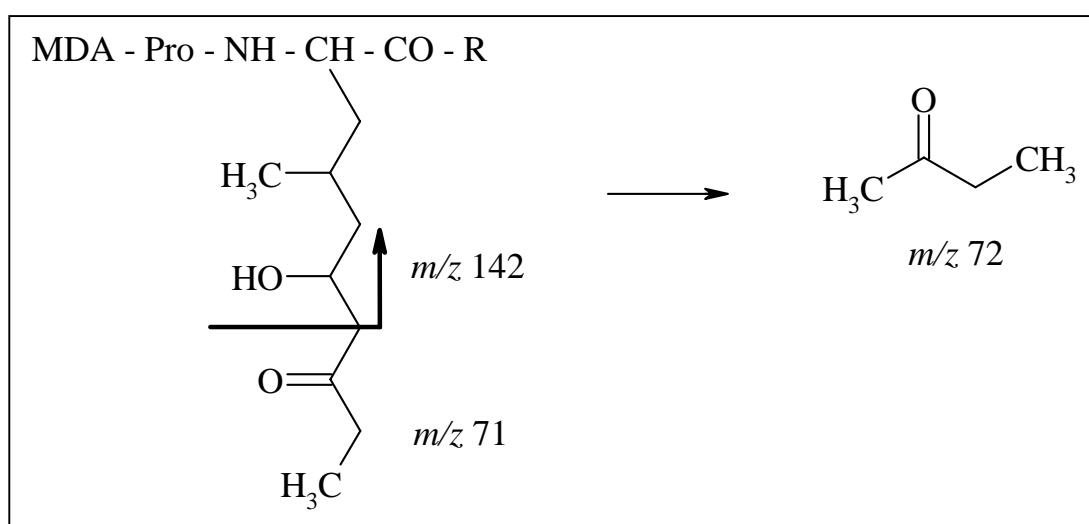
Erkennbar sind mehrere Reihen von diagnostischen-B-Typ-Fragment-Ionen. Die Sequenz des Roseoferins  $B_1$  ist rot dargestellt, die des Roseoferins  $B_2$  blau. Als eine Minorkomponente wird Helioferin B (vgl. Fragmentierung in **Abb. 11, oben**) gebildet. Die Existenz weiterer Minorkomponenten (siehe Ion mit  $m/z$  536) ist wahrscheinlich, konnte auf Grund der geringen Intensität dieses Ions nicht weiter experimentell untersucht werden.

#### ESI-Ion-Trap-MS<sup>3</sup>-Spektrum des diagnostischen MS<sup>2</sup>-Fragment-Ions $B_7$ mit $m/z$ 932 (**unten**)

Aus dem diagnostischen MS<sup>2</sup>-Tochterion  $B_7$  mit  $m/z$  932 entstehen zwei Serien von MS<sup>3</sup>-Enkelionen. Die Existenz des positionsisomeren Roseoferins  $B_3$ , dessen Sequenz grün dargestellt ist, wurde durch das Auftreten des diagnostischen MS<sup>3</sup>-Fragment-Ions  $B_5$  mit  $m/z$  734, neben dem des Roseoferins  $B_2$  mit  $m/z$  748 bestätigt.

Das Auftreten weiterer diagnostischer  $MS^n$ -Fragmente (siehe **Abb. 12**, oben -  $m/z$  536, 607, 621, bzw. 720) spricht für die Bildung einer Anzahl zusätzlicher homologer Minorkomponenten; jedoch konnten in diesen Fällen meist lediglich Partialsequenzen ermittelt und daher keine komplette Strukturzuordnung vorgenommen werden. Eine Ausnahme bildete das Helioferin B, dessen Anwesenheit als Minorkomponente des Roseoferin-Komplexes ebenfalls durch  $MS^n$ -Untersuchungen bestätigt wurde.

Zum besseren Verständnis der  $MS^n$ -Fragmentierungen trug ferner die Beobachtung bei, daß zusätzlich zu den diagnostischen B-Typ-Fragmenten im  $MS^2$  aller Roseoferine und Helioferine ein intensitätsstarkes Fragment mit  $[M-C_3H_5O]^+$  auftrat, das durch  $\alpha$ -Spaltung an der AHMOD-Untereinheit entsteht (siehe  $m/z$  1063,7 in **Abb. 13**):



**Abb. 13:** Entstehung des diagnostischen Fragment-Ions  $[M-C_3H_5O_2]^+$  im ESI-MS von AHMOD-haltigen Lipoaminopeptiden

Das Auftreten dieses diagnostischen Fragment-Ions stellte damit einen weiteren Beweis für das Vorhandensein der AHMOD in den Roseoferinen dar. Dieser Fragmentierungstyp war auch in den  $MS^3$ - und  $MS^4$ -Experimenten zu beobachten. So lieferte die weitere Fragmentierung des  $MS^2$ -Tochterions  $m/z$  1063,7 eine dem  $MS^2$  des  $[M+H]^+$ -Ions entsprechende, jedoch um  $-72$  amu versetzte Sequenz. Die Strukturen der Roseoferine D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> und F entsprechen denen der Helioferine A und B, unterscheiden sich jedoch von ihnen durch den Austausch der Aminosäuren in Position 6 und 7 der Peptidkette (siehe **Tab. 4**).

Molekulargewichte, Summenformeln und relative Intensität der sieben  $[M+H]^+$ -Quasi-Molekül-Ionen des Roseoferin-Komplexes sind in **Tab. 3** dargestellt. Die durch Peak-

Matching ermittelten Molekulargewichte zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten und beweisen die Strukturen der Einzelkomponenten. Gewöhnlich wird Roseoferin A<sub>1</sub> als Hauptkomponente, gefolgt von den Roseferinen, B, C und D, produziert. Als Maßstab hierfür diente die relative Intensität der Quasi-Molekül-Ionen bzw. der Tochterionen im MS<sup>n</sup>.

**Tab. 3:** Molekulargewichte, Summenformeln und relative Intensität der sieben

[M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ionen des Roseoferin-Komplexes

Roseoferin	[M+H] <sup>+</sup> im HRESI-MS [ <i>m/z</i> ]		Relative Intensität	Summenformel
	berechnet	gefunden		
G	1177,8539	nicht bestimmbar	0,5	C <sub>61</sub> H <sub>113</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub>	1163,8383	1163,8364	20	C <sub>60</sub> H <sub>111</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub>	1149,8226	1149,8211	100	C <sub>59</sub> H <sub>109</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub>	1135,8072	1135,8111	40	C <sub>58</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
D <sub>1</sub> , D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub>	1121,7913	1121,7950	10	C <sub>57</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> , E <sub>3</sub>	1107,7757	1107,7797	5	C <sub>56</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
F	1093,7601	1093,7618	1	C <sub>55</sub> H <sub>101</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>

Im Falle des Roseoferins G existieren offenbar noch eine Anzahl weiterer Positionsisomere. Dies wurde durch das Auftreten von mehreren Reihen diagnostischer Fragment-Ionen im MS<sup>2</sup> bestätigt; jedoch ließ die sehr geringe Intensität des Quasi-Molekül-Ions bei *m/z* 1178 keine weiteren MS<sup>3</sup>-Experimente zu.

Durch Kombination von ESI-Triple Quadrupol-CID-MS/MS und ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup> konnte in Reinkulturen des Stammes *Mycogone rosea* DSM 12973 ein Komplex homologer linearer Lipoaminopeptide nachgewiesen werden. Von den insgesamt 18 in ihrer Sequenz aufgeklärten Homologen erwiesen sich 16 als Verbindungen mit neuer chemischer Struktur; die übrigen beiden wurden als die aus Kulturen von *Mycogone rosea* DSM 8822 bekannten Helioferine A und B [GRÄFE *et al.*, 1995] identifiziert.

**Tab. 4:** Strukturen der Roseoferine A – G aus Reinkulturen von *Mycogone rosea* DSM 12973

a.) Sequenzen der Fett- und Aminosäuren der Einzelkomponenten des Roseoferin-Komplexes

b.) Diagnostische B-Typ-Fragment-Ionen der Einzelkomponenten des Roseoferin-Komplexes

Roseoferin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Val	Ile	Ile	Aib	Aib	AMAE
C <sub>1</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Ile	Aib	Aib	AMAE
C <sub>2</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Val	Val	Ile	Aib	Aib	AMAE
A <sub>1</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AMAE
A <sub>2</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AMAE
A <sub>3</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Ile	Aib	Aib	AAE
B <sub>1</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Val	Val	Aib	Aib	AMAE
B <sub>2</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AAE
B <sub>3</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AAE
D <sub>1</sub>	MDA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Val	Val	Aib	Aib	AAE
D <sub>2</sub>	MOA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AMAE
D <sub>3</sub>	MOA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AMAE
E <sub>1</sub>	MOA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AAE
E <sub>2</sub>	MOA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AAE
E <sub>3</sub>	MOA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Val	Val	Aib	Aib	AMAE
F	MOA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Val	Val	Aib	Aib	AAE
Helioferin A	MOA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Ile	Aib	Aib	AAE
Helioferin B	MOA	Pro	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Ile	Aib	Aib	AMAE

Roseoferin	1	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
G	169	266	479	550	649	762	875	960	1045	1178
C <sub>1</sub>	169	266	479	550	635	748	861	946	1031	1164
C <sub>2</sub>	169	266	479	550	649	748	861	946	1031	1164
A <sub>1</sub>	169	266	479	550	635	748	847	932	1017	1150
A <sub>2</sub>	169	266	479	550	635	734	847	932	1017	1150
A <sub>3</sub>	169	266	479	550	635	748	861	946	1031	1150
B <sub>1</sub>	169	266	479	550	635	734	833	918	1003	1136
B <sub>2</sub>	169	266	479	550	635	748	847	932	1017	1136
B <sub>3</sub>	169	266	479	550	635	734	847	932	1017	1136
D <sub>1</sub>	169	266	479	550	635	734	833	918	1003	1122
D <sub>2</sub>		238	451	522	607	720	819	904	989	1122
D <sub>3</sub>		238	451	522	607	706	819	904	989	1122
E <sub>1</sub>		238	451	522	607	706	819	904	989	1108
E <sub>2</sub>		238	451	522	607	720	819	904	989	1108
E <sub>3</sub>		238	451	522	607	706	805	890	975	1108
F		238	451	522	607	706	805	890	975	1094
Helioferin A		238	451	522	607	720	833	918	1003	1122
Helioferin B		238	451	522	607	720	833	918	1003	1136

### 3.2.1.6.2. Untersuchungen zur Struktur der Aminosäuren im salzsauren Roseoferin-Hydrolysat:

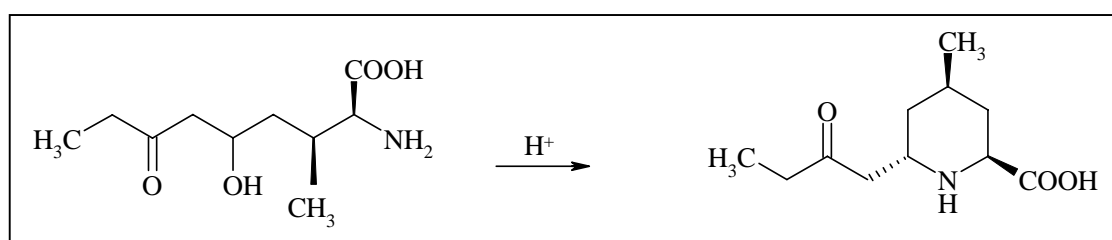
Eine weitere Bestätigung für das Vorhandensein einzelner charakteristischer Bausteine der im Roseoferin-Komplex enthaltenen Komponenten wurde durch ESI-MS-Untersuchungen des salzsauren Roseoferin-Hydrolysats erbracht.

**Tab. 5:** Diagnostische  $[M+H]^+$ -Ionen im salzsauren Hydrolysat des Roseoferin-Komplexes

Fragment $[m/z]$	zugeordnete Struktur ( $[M+H]^+$ )
58	$C_3H_8N^+$ aus dem AMAE/AAE
72	$C_3H_5NO^+$ aus dem Ala
85	aus dem Ile
90	Ala
104	Aib
116	Pro
119	AAE
132	Ile
133	AMAE
214	MOBPA

Als Standard diene ein Gemisch der Helioferine A und B, das unter den gleichen Bedingungen hydrolysiert und vermessen wurde (siehe Material und Methoden).

Das in **Tab. 5** angegebene Fragment  $m/z$  214 entspricht dem diagnostischen  $[M+H]^+$ -Ion der 4-Methyl-6-(2-oxobutyl)-2-piperidincarbonsäure (MOBPA), die unter stark sauren Bedingungen durch Dehydrierung infolge MICHAEL-Addition und anschließender Cyclisierung aus dem 2-Amino-4-methyl-6-hydroxy-8-oxo-decansäure-Rest (AHMOD) der Helioferine [GRÄFE *et al.*, 1995], Leucinostatine [MORI *et al.*, 1982] und Trichopolyne [FUJITA *et al.*, 1981] entsteht (siehe **Abb. 14**).

**Abb. 14:** Bildung von MOBPA aus AHMOD bei der salzsauren Hydrolyse der Antibiotika des Roseoferin-Helioferin-Komplexes

Durch Derivatisierung mit  $N_{\alpha}$ -(2,4-dinitro-5-Fluoro-phenyl)-1-L-alanin-amid (FDAA, MARFEYs Reagenz) und Vergleich der Retentionszeiten mit entsprechenden Standards (siehe **Tab. 6**) wurde festgestellt, daß sämtliche im salzsauren Hydrolysat des Roseoferins



enthaltenen Aminosäuren S-Konfiguration besitzen. Im Gegensatz zu den Aminosäuren reagiert jedoch MOBPA nicht mit FDAA.

**Tab. 6:** Retentionszeiten der FDAA-Aminosäuren in den salzsauren Hydrolysaten des Helioferins und Roseoferins im Vergleich zu FDAA-Aminosäure-Standards

Retentionszeit des FDAA-Derivats [min]			
Aminosäure	Standard	Helioferin-Hydrolysat	Roseoferin-Hydrolysat
L-Ala	22,4	22,1	22,4
D-Ala	27,6	-	-
L-Pro	24,1	23,9	23,9
D-Pro	27,3	-	-
Aib	30,5	30,5	30,5
FDAA	31,7	31,9	31,9
L-Val	31,6	31,5	31,5
D-Val	38,5	-	-
L-Ile	37,8	37,7	37,7
D-Ile	43,7	-	-

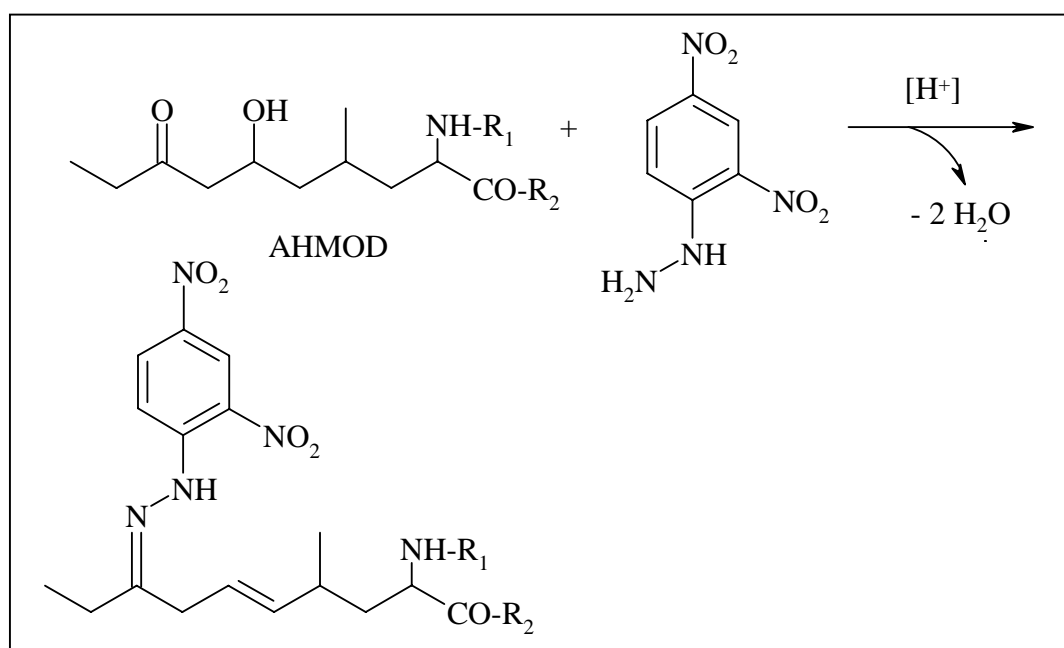
### 3.2.1.6.3. Untersuchungen zur Struktur der N-terminalen Fettsäuren im salzsauren Roseoferin-Hydrolysat:

Aufgrund des Auftretens des intensiven Fragments mit  $m/z$  238 (MOA-Pro) bzw.  $m/z$  210 (MOA-Pro-CO, siehe **Abb. 11, oben**), ist davon auszugehen, daß die Roseoferine D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, und F dieselbe terminale Fettsäure (2-Methyloctansäure, MOA) wie die Helioferine A und B enthalten. Im Gegensatz dazu, wies das Fragment der C-terminalen Fettsäure der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G 28 zusätzliche Masseneinheiten auf (siehe **Abb. 11, unten**), so daß es sich entweder um ein Carbonyl- oder ein Dimethyl- bzw. Dimethylen-Homologes des 2-Methyloctansäure-Rests handeln könnte.

Zur Klärung der Struktur der N-terminalen Fettsäure-Reste wurde der Roseoferin-Komplex mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt. So sollte es bei Anwesenheit zweier Carbonylgruppen zur Bildung eines Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazons kommen, während eine Carbonylgruppe lediglich ein Mono-2,4-Dinitrophenylhydrazon ergeben würde.

Als  $[M+H-OH]^+$ -Ion der Hydrazone der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> (Strukturen, siehe **Tab. 4**) wurde  $m/z$  1311 ermittelt; die Molmassen der homologen Hydrazone sind dazu um jeweils 14 amu bzw. ein Vielfaches davon verschoben. Als Referenzsubstanz diente ein Gemisch der Helioferine A und B, die Mono-2,4-Dinitrophenylhydrazone mit  $m/z$  1283 bzw. 1297 lieferten. Die Strukturen beider Hydrazone wurde mittels ESI-Triple-Quadrupol-CID-

MS/MS-Untersuchungen bestätigt. Neben der Wasserabspaltung bei der Reaktion der Carbonylgruppe in Position 8 der AHMOD mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ist zudem ein Verlust der Hydroxyl-Gruppe in Position 6 unter den stark sauren Reaktionsbedingungen zu beobachten. Dieser Reaktionsverlauf ist in **Abb. 15** dargestellt. Die Monohydrazonbildung lieferte ein erstes gewichtiges Argument dafür, daß in den Roseoferinen A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G eine N-terminale Fettsäure mit einer zusätzlichen C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Gruppe vorhanden ist.



**Abb. 15:** Bildung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen der Roseoferine und Helioferine

Die Umsetzung in schwefelsaurer ethanolischer Lösung (pH [ 1) ist mit einer Abspaltung der Hydroxylgruppe in Position 6 der AHMOD verbunden.

Eine weitere Bestätigung wurde durch CID-MS/MS-Untersuchungen des diagnostischen N-terminalen Alkanoyl-Prolyl-Fragment-Ions der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G mit  $m/z$  266 (B<sub>1</sub> in **Tab. 4**) erreicht, bei der das diagnostischen MS/MS-Tochterion der MDA bei  $m/z$  168 beobachtet wurde.

Durch die Präzisionsmassenbestimmung des diagnostischen N-terminalen Alkanoyl-Prolyl-Fragment-Ions ( $m/z$  266) nach der Peak-Matching-Methode wird eine Genauigkeit von !2 ppm, entsprechend !2 mmu bei einem Molekulargewicht von  $m/z$  [1000 erreicht. Dadurch ist die eindeutige Unterscheidung von CO- und C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Gruppe möglich: Während die

monoisotopische Masse einer Carbonylgruppe  $m/z$  27,9949 beträgt, ist die einer  $C_2H_4$ -Gruppe  $m/z$  28,0313. Dies entspricht einer Differenz von 36,4 mmu. Im HRESI-MS wurde eine Präzisionsmasse von  $m/z$  266,2112 (berechnet  $m/z$  266,2120 für  $C_{16}H_{28}NO_2$ ) ermittelt.

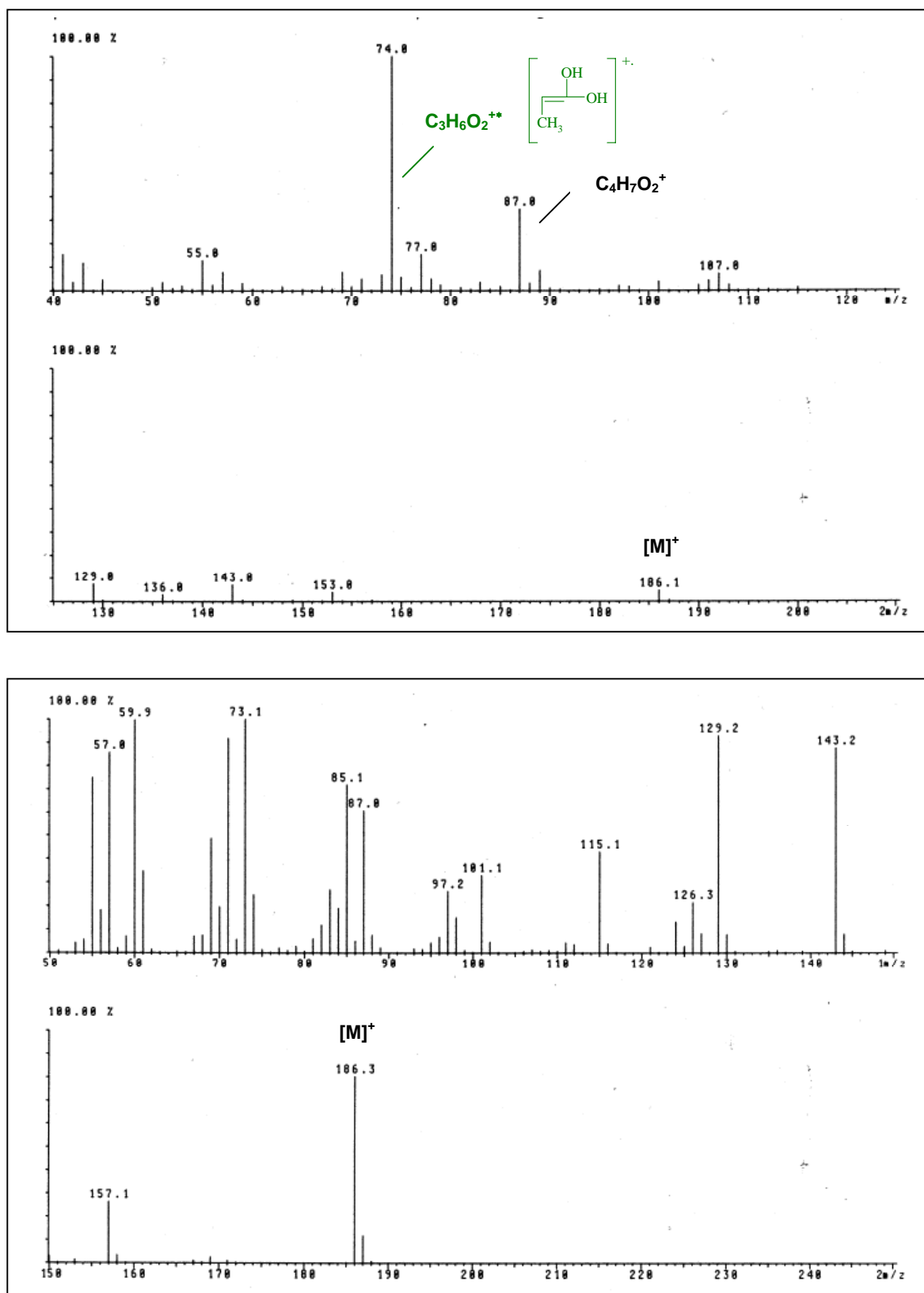
Die molekulare Zusammensetzung des Fragments mit  $m/z$  266 belegt, daß sich der Alkanoyl-Prolyl-Rest der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G von dem der Helioferine A und B durch eine Fettsäure mit zusätzlicher  $C_2H_4$ -Gruppe unterscheidet. Das Vorhandensein einer CO-Gruppe war somit eindeutig auszuschließen.

Zur Abtrennung störender hydrophiler Hydrolyse-Produkte wurde das salzsaure Roseoferin-Hydrolysat mit  $CHCl_3$  extrahiert. Von dem auf diese Weise erhaltenen Extrakt wurde nunmehr ein ESI-MS aufgenommen, das vom  $[M-H]^-$ -Ion der MDA bei  $m/z$  185 mit einer relativen Intensität von 100% dominiert wird; ferner ist das  $[M-H]^-$ -Ion der MOA bei  $m/z$  157 mit 5% Intensität nachweisbar. Durch LC/MS-Kopplung wurde der Chloroformextrakt weiter analysiert. Nach einer Retentionszeit von 14,56 min wurde das  $[M-H]^-$ -Ion der MDA bei  $m/z$  185 sowie die korrespondierenden  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  und  $[M+K]^+$ -Ionen im positiven Meßmodus nachgewiesen. HREI-MS-Untersuchungen des  $[MDA-H]^-$ -Ions bestätigten dessen Summenformel (gefunden:  $m/z$  185,1529; berechnet:  $m/z$  185,1542 für  $C_{11}H_{21}O_2$ ). Auf Grund der Ergebnisse der speziellen HREI-MS-Untersuchungen des  $CHCl_3$ -Extrakts des salzsauren Roseoferin-Hydrolysates kann eindeutig davon ausgegangen werden, daß die Methyl-Verzweigung im Fettsäure-Rest der entsprechenden Roseoferine in  $\alpha$ -Position zur Carboxyl-Gruppe lokalisiert ist. Der Basispeak des in **Abb. 16 oben** dargestellten Spektrums bei  $m/z$  74,0364 (berechnet:  $m/z$  74,0368) entspricht der Summenformel  $C_3H_6O_2^{+3}$  und wird als charakteristisches Mc-Lafferty-Fragment im EI-MS  $\alpha$ -methylverzweigter Carbonsäuren angegeben [PRETSCH *et al.*, 1989]. Ein weiteres intensitätsstarkes Fragment bei  $m/z$  87,0441 (berechnet:  $m/z$  87,0446) entspricht der Summenformel  $C_4H_7O_2^+$ . Des weiteren bestätigt das HREI-MS den Molpeak der Säure bei  $m/z$  186,1619 (berechnet:  $m/z$  186,1620 für  $C_{11}H_{22}O_2$ ).

Diese Ergebnisse wurden durch Vergleich des EI-MS der 2-Methyldecansäure mit Literaturangaben [National Institute of Standard and Technology – Standard Reference Database 69, EPA MS number 114794, November 1998] und Vermessung eines EI-MS der isomeren n-Undecansäure untermauert, deren Fragmentierungsverhalten aus **Abb. 16 (unten)** und **Tab. 7** ersichtlich ist. Die Massenspektren dieser beiden isomeren Säuren unterscheiden sich beträchtlich voneinander. In der Literatur [PRETSCH *et al.*, 1989] wird als Basispeak des Spektrums das für n-Alkansäuren charakteristische Mc-Lafferty-Ion  $m/z$  60 ( $C_2H_4O_2^+$ ) angegeben. Das Fragmentierungsmuster konnte durch Literaturangaben [National Institute of Standard and Technology – Standard Reference Database 69, EPA MS number 113003, November 1998] bestätigt werden. Erkennbar ist eine gleichmäßige Fragmentierung entsprechend der allgemeinen Formel  $C_nH_{(2n-1)}O_2^+$ . Die in **Tab. 7** dargestellten Struktur der diagnostischen Ionen bei  $m/z$  73; 85; 87; 115; 129; 143 und 157 sowie die Summenformel des Molpeaks bei  $m/z$  186 wurde durch HREI-Präzisionsmassenbestimmung ermittelt. Das Fragment  $C_5H_9O^+$ , entsprechend der Struktur  $H_3C-(CH_2)_3\eta CO^+$ , wird als typisch für Fettsäuren angegeben [PRETSCH *et al.*, 1989].

**Tab. 7:** Fragmentierungsmuster von n-Undecansäure im EI-MS

Präzisionsmasse [ $m/z$ ]		Summenformel des Fragments
gefunden	berechnet	
73,0292	73,0290	$C_3H_5O_2^+$
85,0627	85,0653	$C_5H_9O^+$
87,0437	87,0446	$C_4H_7O_2^+$
115,0753	115,0759	$C_6H_{11}O_2^+$
129,0924	129,0916	$C_7H_{13}O_2^+$
143,1056	143,1072	$C_8H_{15}O_2^+$
157,1212	157,1229	$C_9H_{17}O_2^+$
186,1616	186,1620	$C_{11}H_{22}O_2 [M]^+$



**Abb. 16:** EI-MS der 2-Methyldecanoic acid aus dem  $\text{CHCl}_3$ -Extrakt des salzsauren Roseoferin-Hydrolysats (**oben**) und der isomeren n-Undecanoic acid (**unten**)

Im oberen Spektrum sind neben dem Molpeak die diagnostischen Fragment-Ionen einer  $\alpha$ -Methylcarbonsäure dargestellt. Fragmentierung von n-Undecanoic acid siehe **Tab. 7**.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß folgende Ergebnisse eindeutig das Vorhandensein von 2-Methyldecansäure als terminale Fettsäure der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G belegen:

- Die Bildung eines Mono-2,4-Dinitrophenylhydrazons bei Umsetzung des Roseoferin-Komplexes mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin;
- Das Auftreten des MS/MS-Tochterions  $m/z$  168 als Säurerest der MDA bei CID-MS/MS-Untersuchungen des diagnostischen Alkanoyl-Prolyl-Fragments  $m/z$  266 und die durch Peak-Matching bestimmte Präzisionsmasse dieses Fragments.
- Die völlig andere Fragmentierung der im CHCl<sub>3</sub>-Extrakt des salzsauren Roseoferin-Hydrolysats nachgewiesenen Fettsäure im Vergleich zu der isomeren Referenzsubstanz n-Undecansäure: Das Auftreten des diagnostischen Mc-Lafferty-Fragment-Ions C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub><sup>+3</sup> als Basispeak bei  $m/z$  74, ist typisch für  $\alpha$ -methylverzweigte Carbonsäuren.

Auf Grund dieser Ergebnisse war nunmehr eine komplette Zuordnung der diagnostischen B-Typ-Fragmente zu den entsprechenden Fett- und Aminosäuresequenzen aller Roseoferine möglich.

#### 3.2.1.7. Biologische Aktivität des Roseoferin-Komplexes:

Die antibiotische Aktivität des Roseoferin-Komplexes ist *in vitro* (siehe **Tab. 8**) vor allem gegen grampositive Bakterien, einschließlich Vertreter der Gattung *Mycobacterium*, gerichtet; außerdem werden filamentöse Pilze und Hefen, einschließlich der humanpathogenen *Candida albicans*, erfaßt. Die getesteten gramnegativen Bakterien erwiesen sich hingegen als resistent (MHK > 100 µg/ml). Qualitativ entspricht das antibiotische Wirkungsspektrum dem der bisher bereits in der Literatur beschriebenen Lipoaminopeptide [ARAI *et al.*, 1973; SATO *et al.*, 1980; ISOGAI *et al.*, 1981; ROSSI *et al.*, 1987; RADICS *et al.*, 1987; FUJI *et al.*, 1978; GRÄFE *et al.*, 1995].

**Tab. 8:** Antibiotische Aktivität des Roseoferin-Komplexes (*in vitro*)

Testkeim	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	> 50*
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	3,12*
<i>Staphylococcus aureus</i> SG 511	12,5*
<i>Staphylococcus aureus</i> 134/94	25*
<i>Enterococcus faecalis</i> 1528	12,5*
<i>Mycobacterium smegmatis</i> SG 987	6,25*
<i>Mycobacterium aurum</i> SB 66	6,25*
<i>Mycobacterium vaccae</i> IMET 10670	3,12*
<i>Mycobacterium fortuitum</i> Borstel	25*
<i>Mycobacterium chelonii</i> Borstel	50*
<i>Escherichia coli</i> SG 458	> 100*
<i>Pseudomonas pyocyaneus</i> SG 137	> 100*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K 799/61	> 100*
<i>Candida albicans</i> BMSY 212	1,56**
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> SBUG 549	0,39***
<i>Penicillium notatum</i> JP 36	0,39***

MHK ermittelt durch:   \*   - Mikrotitertest für Aerobier nach NCCLS  
                               \*\*   - Mikrotitertest für Hefen nach NCCLS  
                               \*\*\*   - Lochplatten-Agardiffusionstest nach EAB 3, deutsche Ausagabe

Für den Roseoferin-Komplex wurden zudem starke antiproliferative und zytotoxische Effekte nachgewiesen (siehe **Tab. 9**). Die Hemmung muriner Fibroblasten deutet jedoch auf eine nicht-selektive Toxizität hin, so daß eine weitere biologische Ausprüfung in den am HKI etablierten antiviralen und Rezeptorbindungs-Assays nicht durchgeführt werden konnte.

**Tab. 9:** Antiproliferative und zytotoxische Aktivität des Roseoferin-Komplexes (*in vitro*), bestimmt nach WINKELMEIER *et al.* [1993]

Effekt	Zell-Linie	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{g/ml}$ ]
- antiproliferativ	L 929 (murine Fibroblasten)	0,4
- zytotoxisch	K 562 (humane Leukämie)	0,08
	HeLa (humanes Cervicalcarcinom)	3,3

Für die Helioferine [GRÄFE *et al.*, 1995], Leucinostatine A, B [ARAI *et al.*, 1973; MORI *et al.*, 1983] und D [ROSSI *et al.*, 1987] sowie die Trichopolyne [TERADA *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse; zitiert in MIKAMI *et al.*, 1984; IIDA *et al.*, 1999] wurden etwas

stärkere zytotoxische Aktivitäten beschrieben. MIKAMI *et al.* [1984] stuften die Leucinostatine A und B daher in die Kategorie der gefährlichen Mykotoxine ein.

3.2.1.8. Untersuchungen zu qualitativen Strukturveränderungen des Roseoferin-Komplexes durch „Vorläufer-orientierte Biosynthese“:

3.2.1.8.1. Allgemeine Bemerkungen zur Modifizierung der Struktur von Peptid-Antibiotika durch „Vorläufer-orientierte Biosynthese“:

Vor Beginn der Untersuchungen zur Kofermentation des Roseoferin-Bildners mit geeigneten Partnern wurde die Möglichkeit einer qualitativen Strukturveränderung der Antibiotika des Roseoferin-Komplexes durch „Vorläufer-orientierte Biosynthese“ diskutiert, da die Substrattoleranz der an der Biosynthese der Roseoferine beteiligten Multienzym-Komplexe eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg einer Kofermentation von *Mycogone rosea* DSM 12973 mit heterologen Mikroorganismen, die als „Vorläufer-Donoren“ fungieren, darstellt.

Die bisher bekannten Enzyme der nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese zeigen nur eine relativ begrenzte Spezifität, so daß strukturelle Variationen der gebildeten Metabolite bei Zufütterung geeigneter Vorläufer möglich sind. Eine weiterer Ausdruck der begrenzten Substratspezifität ist das häufig zu beobachtende Auftreten zahlreicher nativer Isomere und Homologe, wie auch im Falle der Roseoferine gezeigt wurde. Durch Fütterung von Vorläufern bestimmter Strukturen der Biosynthese sind in den letzten Jahren zahlreiche Analoga des Gramacidins S, der Tyrocidine, linearen Gramacidine, Enniatine, Cyclosporine u. a. über den Thiotemplat-Mechanismus der nicht-ribosomalen Peptidsynthese an Proteinmatrizen gebildeter Peptid-Antibiotika erhalten worden. Dabei werden vor allem strukturelle Analoga der in der Sequenz vorhandenen Bausteine akzeptiert. Neben diesen variablen Positionen existieren jedoch auch konservative Regionen innerhalb der Baupläne solcher Peptide. Diese sind offenbar für die biologische Aktivität essentiell und garantieren durch ihre Invariabilität, daß die Interaktion mit Target-Molekülen erhalten bleibt [Übersicht in KLEINKAUF & von DÖHREN, 1997].

Als prominentes Beispiel für eine Veränderung des Peptidspektrums durch Zufütterung von Präkursor-Aminosäuren zu Kulturen sei hier der Cyclosporin-Bildner *Tolypocladium inflatum* genannt. In Kulturen dieses Deuteromyceten ist in den letzten zwanzig Jahren eine Vielzahl strukturell modifizierter Cyclosporine mit z. T. bemerkenswerten biologischen Aktivitäten aufgefunden worden [KOBEL & TRABER, 1982; von DÖHREN & KLEINKAUF, 1999]. In vielen Fällen wurde hierbei mit halbsynthetischen Medien gearbeitet, die eine komplexe



Stickstoff-Quelle enthalten. So verwendeten TRABER *et al.* [1989] neben der zu fütternden Präkursor-Aminosäure bevorzugt Casein-Pepton als komplexe Stickstoff-Quelle. Um jedoch eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen und somit den Einfluß einzelner Bestandteile des Nährmediums besser beurteilen zu können, wurde bewußt auf den Einsatz komplexer Zusätze, wie Peptone oder Pflanzenmehle verzichtet, deren qualitative und quantitative Zusammensetzung oftmals beträchtlichen Schwankungen unterworfen ist. Dies schaffte zudem eine bessere Ausgangsbasis für evtl. spätere Versuche zur phänotypischen Optimierung der Produktbildung des Stammes *Mycogone rosea* DSM 12973. Zwar sind die Ausbeuten im Falle des Cyclosporins bei Verwendung chemisch definierter Medien als generell niedriger im Vergleich zu komplexen Substraten beschrieben worden [KOBEL & TRABER, 1982]; jedoch wird dieser Nachteil durch die oben erwähnten offensichtlichen Vorteile eines solchen Mediums kompensiert.



#### 3.2.1.8.2. Optimierung der qualitativen Zusammensetzung des chemisch definierten Mediums:

Bei der Anzucht von *Mycogone rosea* DSM 12973 auf Wb6-1/14-Flüssigmedium war bei Verwendung einer Glucose-Konzentration von 100g/l nach 7- bzw. 14tägiger Kultivierung trotz guten Wachstums kein Roseoferin im Ansatz nachweisbar. Submerse und emerse Kulturführung erbrachten hierbei keine Unterschiede. Im Gegensatz hierzu wurde auf dem als Kontrolle verwendeten Malzmedium eine gute Produktbildung registriert. Es bestand daher Grund zu der Annahme, daß die verwendete hohe Glucose-Konzentration von 100g/l die Produktbildung reprimiert. Aus diesem Grunde wurde die zu verwendende Kohlenhydrat-Gesamtkonzentration auf 40g/l reduziert. In einer weiteren Versuchsreihe, deren Ergebnisse in **Tab. 10** dargestellt sind, wurde der Einfluß verschiedener Kohlenhydrate auf die Produktbildung überprüft. Es wurden jeweils 30 g/l des zu prüfenden Kohlenhydrats zugesetzt und mit D-(+)-Glucose zu 40 g/l ergänzt. Eine Ausnahme bildete Variante 7, bei der 40 g/l Maltose als einzige C-Quelle verwendet wurden.

**Tab. 10:** Ergebnisse der Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Kulturvariante und des für die Produktbildung günstigsten Kohlenhydrats

Variante	Ansatz	Reaktion der Kulturvarianten im Zweiphasen-Transfertest		
		7 Tage	18 Tage	
		submers	submers	emers
K	Kontrolle	(+ +)	(+ +)	(+ +)
<b>Wb 6-1/14 mit 0,4% Agar-Agar und dem zu prüfenden Kohlenhydrat*:</b>				
1	D-(+)-Glucose	(+)	(-)	(-)
2	D-(+)-Galactose	(+)	(-)	(-)
3	D-Fructose	(+ +)	(-)	(-)
4	Saccharose	(+ )	(-)	(-)
5	Cellobiose	(+ +)	(+ +)	(+ +)
6	30 g/l Maltose	(+ + +)	(+ +)	(+ +)
7	40 g/l Maltose	(+ + + +)	(+ + +)	(+ + +)
8	Amylose	(-)	(-)	(-)

\*Grad der positiven Reaktion: (+) schwach positiv, (+ +) mäßig positiv, stark positiv (+ + +), (+ + + +) sehr stark positiv, (+ + + + +) Methylorange vollständig in der oberen Phase

Aus den in **Tab. 10** dargestellten Versuchsergebnissen ist ersichtlich, daß eine siebentägige submerse Kulturführung unter Verwendung von Maltose als einziger C-Quelle, die höchsten Ausbeuten an Roseoferin liefert. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Verwendung einer Kombination aus 30 g/l Maltose bzw. Cellobiose mit 10 g/l Glucose erreicht. Reduzierende, - oder -(1,4)-glykosidisch gebundene Disaccharide förderten also offenbar die Produktbildung. Dieses Ergebnis belegt zugleich den günstigen Einfluß von Malzextrakt auf die Produktbildung in komplexen Medien, der, neben anderen reduzierenden Kohlenhydraten, als Hauptbestandteil Maltose enthält [SCHLEE & KLEBER, 1991].

#### 3.2.1.8.3. Versuche zur Substratverwertung und Produktbildung von *Mycogone rosea* DSM 12973 bei Zufütterung verschiedener C- und N-Quellen

In der folgenden Versuchsreihe wurde der Einfluß verschiedener, als einzige N-Quelle verwendeter Aminosäuren auf Wachstum und Produktbildung von *Mycogone rosea* DSM

12973 überprüft. Dabei wurde das im Medium enthaltene  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  durch 1 g/l der jeweils zu prüfenden Aminosäure substituiert. Der Abbau erfolgte nach 7tägiger submerser Kultivierung auf Wb 6-1/14 mit Maltose als C-Quelle. Nach Prüfung der Rohextrakte im Zweiphasen-Transfertest wurden die Roseoferin-positiven Kulturvarianten im ESI-MS auf evtl. qualitative Veränderungen in der Zusammensetzung des Roseoferin-Komplexes untersucht. Ungeachtet der Struktur der jeweils zugesetzten Aminosäure, zeigte *Mycogone rosea* DSM 12973 in allen Kulturvarianten ein sehr gutes Wachstum. Junge Chlamydosporen wurden nur sehr vereinzelt beobachtet; die Azidität der Kulturlösungen lag im Bereich zwischen pH 5,0 und 6,5.

Es wurde gefunden, daß die im Roseoferin-Komplex enthaltenen Aminosäuren – mit Ausnahme des L-Alanins – die Produktbildung reprimierten (siehe **Tab. 11**) Eine Reihe ungewöhnlicher, nicht-proteinogener Aminosäuren sowie das nicht in den Roseoferinen enthaltene L-Leucin, das jedoch, wie im Falle der Leucinostatine, eine Vorstufe in der Biosynthese der AHMOD darstellen könnte [ISOGAI *et al.*, 1992], förderten hingegen die Roseoferin-Bildung, ohne daß es jedoch zur Bildung qualitativ veränderter, in ihrer Struktur modifizierter Verbindungen kam. So könnte der fördernde Einfluß des L-Serins durch dessen potentielle Rolle als Vorstufe des C-terminalen Amins bedingt werden. Diese Beobachtung wurde von KUBOTA [1988] für die linearen Gramacidine A, B und C beschrieben. Ebenso ist die Bedeutung des L-Methionins als Bestandteil des Methylgruppen-Donors S-Adenosylmethionin zu diskutieren, wie durch KOBEL *et al.* im Falle des Cyclosporin-Bildners *Tolypocladium inflatum* gezeigt werden konnte [1983].

Zur exemplarischen Prüfung der Möglichkeit eines eventuellen Einbaus einer nicht-proteinogenen, isomeren Aminosäure wurde schließlich die Kulturvariante mit DL-Norleucin ausgewählt. Hierfür wurden fünf Liter Wb 6-1/14 mit DL-Norleucin als einziger N-Quelle erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert und der Roseoferin-Komplex nach dem in **Abb. 6** dargestellten Schema aufgereinigt, danach der sauren Hydrolyse unterworfen und schließlich mit MARFEYs Reagens umgesetzt. Aus den in **Tab. 12** dargestellten Ergebnissen der HPLC-Trennung der Diastereomeren ist ersichtlich, daß ein Einbau von DL-Norleucin anstelle des L-Isoleucins in die Roseoferine auszuschließen ist. Es ist daher davon auszugehen, daß die jeweils zugefütterten Aminosäuren unspezifisch metabolisiert worden sind und danach eine *de-novo*-Synthese der zum Aufbau des Roseoferin-Komplexes benötigten Bausteine erfolgte, da lediglich L-Isoleucin, jedoch kein DL-Norleucin im Hydrolysat nachgewiesen werden konnte.

**Tab. 11:** Auswirkung verschiedener, als einzige N-Quelle verwendeter Aminosäuren auf die Produktbildung von *Mycogone rosea* DSM 12973

Aminosäure	Reaktion im Zweiphasen-Transfertest nach 7tägiger Kultivierung
L-Pro	(-)
DL-4-Hyp	(+)
DL-Val	(-)
DL-Iva	(-)
<b>DL-Nva</b>	(+ + +)
<b>DL-Leu</b>	(+ + +)
<b>DL-Nle</b>	(+ + +)
DL-Ile	(-)
<b>α-Aib</b>	(+ + +)
<b>α-Aba</b>	(+ + +)
<b>β-Aba</b>	(-)
<b>β-Aba</b>	(+ +)
α-Amino-n-capronsäure	(+)
<b>2,4-DL-DAB (als Hydrochlorid)</b>	(+ + + + +)
DL-Ala	(-)
D-Ala	(-)
L-Ala	(+ +)
<b>β-Ala</b>	(-)
<b>L-Ser</b>	(+ + +)
<b>L-Cys</b>	(+ + +)
<b>L-Met</b>	(+ + +)
DL-Ethionin	(-)
L-Glu	(-)
Gly	(-)
DL-Phe	(-)
DL-Trp	(-)

**Tab. 12:** Exemplarische Prüfung des Einbaus der Aminosäure bei Fütterung von DL-Norleucin

Probe	t <sub>r</sub> [min]	
	Aminosäure	MARFEY's Reagens
<b>DL-Norleucin-Standard:</b>		28,85
- LL-Diastereomer	35,05	
- DL-Diasteromer	41,70	
L-Isoleucin-Standard	34,01	28,71
Hydrolysat <u>vor</u> Dotierung mit L-Isoleucin	34,07	28,78
Hydrolysat <u>nach</u> Dotierung mit L-Isoleucin	34,16	28,89

In der nun folgenden Versuchsreihe wurde der Einfluß verschiedener, als einzige N-Quelle dienender Amine auf Wachstum und Produktbildung des Stammes *Mycogone rosea* DSM 12973 untersucht. Das im Medium enthaltene  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wurde durch 1 g/l des jeweils zu prüfenden Amins substituiert, das dem Medium als steriltfiltrierte, wäßrige Lösung des Hydrochlorids unmittelbar vor der Beimpfung zugesetzt wurde. Aus den in **Tab. 13** dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, daß die geprüften Amine nicht als einzige N-Quelle fungieren können. Der Stamm wuchs bei Fütterung von Ethanolamin mäßig; die Pellets waren klein und nur schwach fransig, das Mycel zeigte im mikroskopischen Bild jedoch keinerlei Auffälligkeiten. Bei Zusatz von Putrescin bzw. Cadaverin wuchs *Mycogone rosea* DSM 12973 schlecht bzw. sehr schlecht, die im mikroskopischen Bild zu beobachtenden Mycelstränge waren kurz und sehr dünn, das Wachstum auf die eingebrachten Impfstücke beschränkt. Eine Bildung von Chlamydosporen konnte bei Zusatz von Putrescin registriert werden. Die Azidität der Kulturen lag in pH-Bereichen zwischen 7,5 und 8,0.

**Tab. 13:** Auswirkung verschiedener, als einzige N-Quelle verwendeter Amine auf die Produktbildung von *Mycogone rosea* DSM 12973

Amin	Reaktion im Zweiphasen-Transfertest nach	
	7tägiger Kultivierung	14tägiger Kultivierung
Ethanolamin	(-)	(-)
Cadaverin	(-)	(-)
Putrescein	(-)	(-)

Weiterhin wurde untersucht, ob die Möglichkeit einer Substitution von Maltose durch Fettsäuren als einzige C-Quelle gegeben ist (siehe **Tab. 14**). Die zu prüfende Fettsäure wurde dem jeweiligen Medium vor der Sterilisation im Autoklaven zugesetzt. Das Mycel von *Mycogone rosea* DSM 12973 blieb jeweils auf die Impfstücke beschränkt, die im mikroskopischen Bild zu beobachtenden Hyphenstränge waren kurz und sehr dünn.

Die n-Caprinsäure schwamm als öliger Film auf dem Medium, die n-Laurinsäure fiel fast vollständig aus dem Nährmedium aus. Eine Bildung von Chlamydosporen konnte jedoch nicht registriert werden. Die Azidität der Kulturen lag im Bereich zwischen pH 5,5 und 6,5.

**Tab. 14:** Auswirkung verschiedener, als einzige C-Quelle verwendeter Fettsäuren auf die Produktbildung von *Mycogone rosea* DSM 12973

Fettsäure	Reaktion im Zweiphasen-Transfertest nach	
	7tägiger Kultivierung	14tägiger Kultivierung
n-Caprinsäure (40 g/l)	(-)	(-)
n-Caprinsäure mit Maltose-Supplement (4 g/l)	(-)	(-)
n-Laurinsäure (40 g/l)	(-)	(-)
n-Laurinsäure mit Maltose-Supplement (4 g/l)	(-)	(-)

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Substitution der Maltose durch ausgewählte Säuren des Tricarbonsäurecyclus und der Glykolyse erreicht (siehe **Tab. 15**). Bei Fütterung von Bernsteinsäure wuchs *Mycogone rosea* DSM 12973 mäßig, bei Zusatz von Fumar-, Citronen- oder Brenztraubensäure sehr schlecht. Ein Zusatz von Maltose trug in keiner der untersuchten Varianten zur Verbesserung des Wachstums bei. Eine Bildung von Chlamydosporen konnte jedoch nicht registriert werden. Die Azidität der Kulturen lag im Bereich zwischen pH 5,5 und 6,5.

**Tab. 15:** Auswirkung verschiedener, als einzige C-Quelle verwendeter organischer Säuren auf die Produktbildung von *Mycogone rosea* DSM 12973

Organische Säure	Reaktion im Zweiphasen-Transfertest nach	
	7tägiger Kultivierung	14tägiger Kultivierung
Bernsteinsäure	(-)	(-)
Bernsteinsäure + Maltose-Supplement (4 g/l)	(-)	(-)
Fumarsäure	(-)	(-)
Fumarsäure + Maltose-Supplement (4 g/l)	(-)	(-)
Citronensäure	(-)	(-)
Citronensäure + Maltose-Supplement (4 g/l)	(-)	(-)
Brenztraubensäure (als Natriumpyruvat)	(-)	(-)
Brenztraubensäure + Maltose-Supplement (4 g/l)	(-)	(-)

Zusammenfassend wurde festgestellt, daß die Substitution der im Medium als einzige C-Quelle enthaltenen Maltose durch Fettsäuren, KREBS-Cyclus-Säuren bzw. Brenztraubensäure die Bildung des Roseoferin-Komplexes vollständig und das Wachstum des Stammes

zumindest teilweise reprimierte. Gleiches galt für die Substitution des als einzige N-Quelle dienenden  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  durch Amine. Diese Beobachtungen entsprachen den Ergebnissen von JOHNSON & McHAN [1975] an Kulturen des Ascomyceten *Monascus purpureus*. Dieser Stamm war ebenfalls nicht in der Lage, auf einem chemisch definierten CZAPEK-DOX-Medium mit Krebs-Cyclus-Säuren, Fettsäuren oder Pyruvat als einziger C-Quelle zu wachsen.

Bei Verwendung einiger definierter Aminosäuren als einzige N-Quelle zeigte *Mycogone rosea* DSM 12973 dagegen ein sehr gutes Wachstum, ungeachtet ihrer Struktur. Dies entspricht den Berichten von McHAN & JOHNSON [1979] über das Wachstum von *Monascus purpureus*. Diese zugefütterte Aminosäure wurde offenbar vollständig metabolisiert und die Bausteine des Roseoferins *de novo* biosynthetisiert, was am Beispiel des DL-Norleucins demonstriert werden konnte.

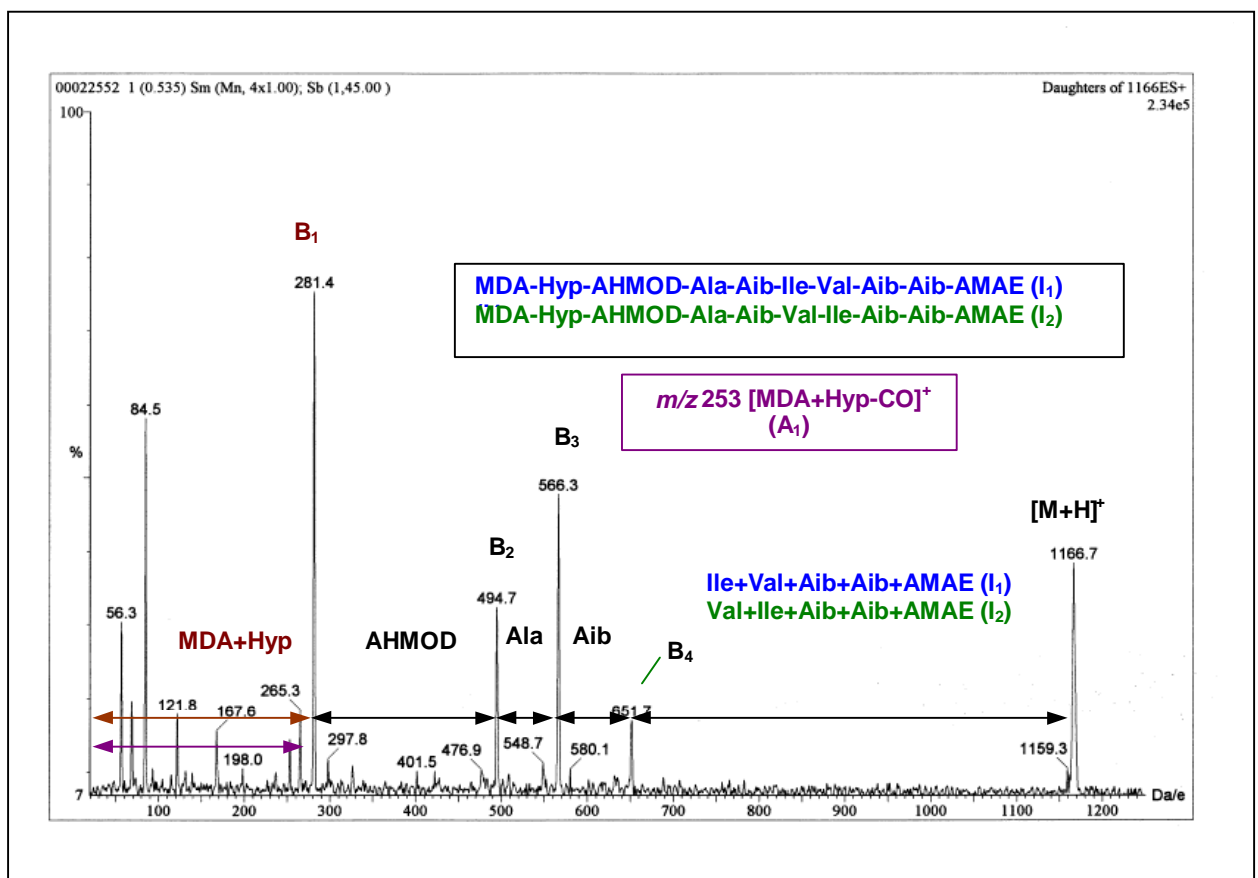
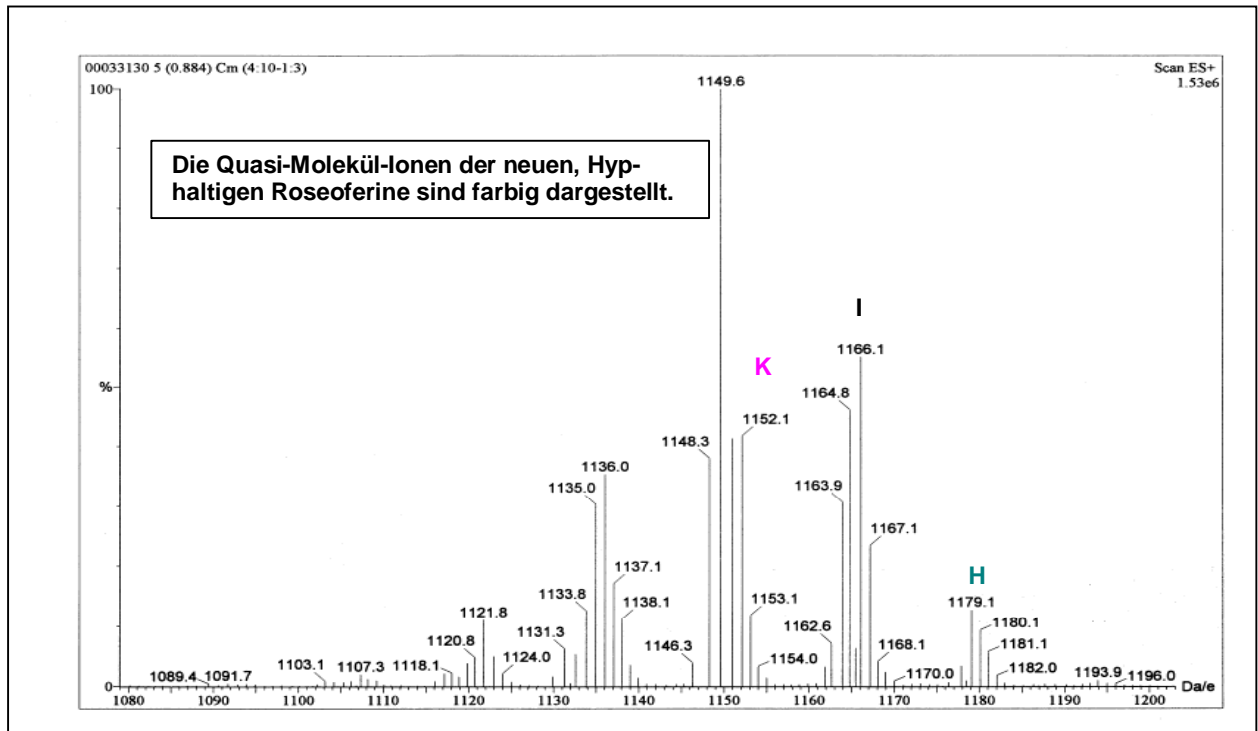
#### 3.2.1.8.4. Strukturelle Modifizierung der Roseoferine durch kombinierte Zufütterung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und L-4-Hydroxyprolin:

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß einer Kombination zweier definierter N-Quellen -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und einer nicht-proteinogenen Aminosäure – auf Wachstum und Produktbildung von *Mycogone rosea* DSM 12973 geprüft. Ein ähnliches Vorgehen wurde von TRABER *et al.* [1989] beschrieben; jedoch unter Verwendung von Caseinpepton als komplexer Stickstoff-Quelle neben dem Präkursor. KOBEL und TRABER [1982] verwendeten hingegen eine definierte Konzentration der Präkursor-Aminosäure, stellten jedoch die Azidität ihres chemisch definierten, äpfelsäurehaltigen Mediums auf einen pH-Wert von 4,5 mittels  $\text{NH}_4\text{OH}$  ein, dessen  $\text{NH}_4^+$ -Ionen als N-Quelle für die Deckung des Bedarfs im Primärstoffwechsel dienten.

Während bei Fütterung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und L-2,4-Diaminobuttersäure bzw.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und  $\alpha$ -Amino-n-capronsäure keine qualitative Veränderung des gebildeten Roseoferin-Komplexes nachgewiesen werden konnte, wurde bei Zusatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und L-4-Hydroxyprolin im  $\text{ESI}^+$ -Triple-Quadrupol-Massenspektrum (**Abb. 17, oben**) eine deutliche Abnahme der relativen Intensität der Quasi-Molekül-Ionen bei  $m/z$  1164 und  $m/z$  1178 beobachtet.

Gleichzeitig traten drei bisher unbekannte Quasi-Molekül-Ionen bei  $m/z$  1152,  $m/z$  1166 und  $m/z$  1180 auf, deren Molmassen im Vergleich zu den drei intensivsten Quasi-Molekül-Ionen

der Roseoferine bei  $m/z$  1136,  $m/z$  1150 und  $m/z$  1164 um jeweils 16 amu nach oben verschoben waren.



**Abb. 17:** ESI-Triple-Quadrupol-Spektrum bei Zufütterung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und L-4-Hydroxyprolin (**oben**) und ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS-Spektrum der Roseoferine I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> (**unten**)



Das ESI<sup>+</sup>-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS-Spektrum des Roseoferin-I-Quasi-Molekül-Ions bei  $m/z$  1166 ist in **Abb. 17 (unten)** dargestellt. Es fällt auf, daß die entstehenden Fragment-Ionen um die schon erwähnte Massendifferenz von  $m/z$  16 gegenüber denen des Roseoferins A nach oben verschoben sind. Die Isomerie der durch Fütterung von L-4-Hydroxyprolin entstandenen neuen Homologen der Roseoferine konnte anhand der Fragmentierung lokalisiert werden. Sie befindet sich entweder in Position 1 oder 2 der Peptidkette, d.h. im Fettsäure- oder im Prolin-Rest. Die Differenzen zwischen den übrigen B-Typ-Fragmenten lassen eine Identität mit den korrespondierenden Fragmenten B<sub>1</sub> bis B<sub>4</sub> der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> erkennen, so daß die rot hervorgehobene Partialsequenz bestätigt wird:



Die Bestimmung der übrigen Fragmente erfolgte mittels ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup>. Aus dem in **Abb. 18 (oben)** dargestellten MS<sup>2</sup>-Spektrum des [M+H]<sup>+</sup>-Ions bei  $m/z$  1165,8 ist die Sequenz der rot dargestellten Fragmente B<sub>2</sub> bis B<sub>8</sub> direkt ablesbar:



Es handelt sich hierbei um das Homologe des Roseoferins A<sub>1</sub>. Da jeweils mehrere Positionsisomere der Roseoferine mit  $m/z$  1136,  $m/z$  1150 und  $m/z$  1164 existieren, sollten auch die korrespondierenden Homologen vorkommen. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden verschiedene MS<sup>2</sup>-Tochterionen im MS<sup>3</sup> fragmentiert. Die in **Abb. 18 (unten)** dargestellte Fragmentierung des MS<sup>2</sup>-Tochterions  $m/z$  948,4 des [M+H]<sup>+</sup>-Ions  $m/z$  1165,8 lieferte zwei Serien von MS<sup>3</sup>-Enkelionen. Durch das Auftreten des diagnostischen Fragment-Ions bei  $m/z$  750,5 neben dem Fragment-Ion  $m/z$  764,3 des Roseoferins I<sub>1</sub> konnte tatsächlich die Anwesenheit des Positionsisomers Roseoferin I<sub>2</sub> bestätigt werden. In dieser Struktur sind - in Analogie zu den Roseoferinen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> - die Isoleucin- bzw. Valin-Reste in Position 6 bzw. 7 der Peptidkette vertauscht.

Die Fragmentierung und die daraus abgeleiteten Sequenzen der Roseoferine H, I und K sind in **Tab. 17** dargestellt. Sie sind denen der korrespondierenden Roseoferine A, B und C homolog (siehe **Tab. 4**), zeigen jedoch die Anwesenheit eines zusätzlichen Sauerstoff-Atoms in den Molekülen. Neben diesen neun in ihrer Struktur bewiesenen Verbindungen ist eine Anzahl weiterer Homologe in Spuren vorhanden. Das zeigt das Auftreten weiterer

diagnostischer MS<sup>n</sup>-Fragmente (siehe **Abb. 18** -  $m/z$  580; 665; 749; 778; 962; 1047) von zusätzlichen Minorkomponenten an. Auf Grund der geringen Menge und niedrigen Intensitäten konnten jedoch lediglich Partialsequenzen ermittelt und daher keine komplette Strukturzuordnung vorgenommen werden.

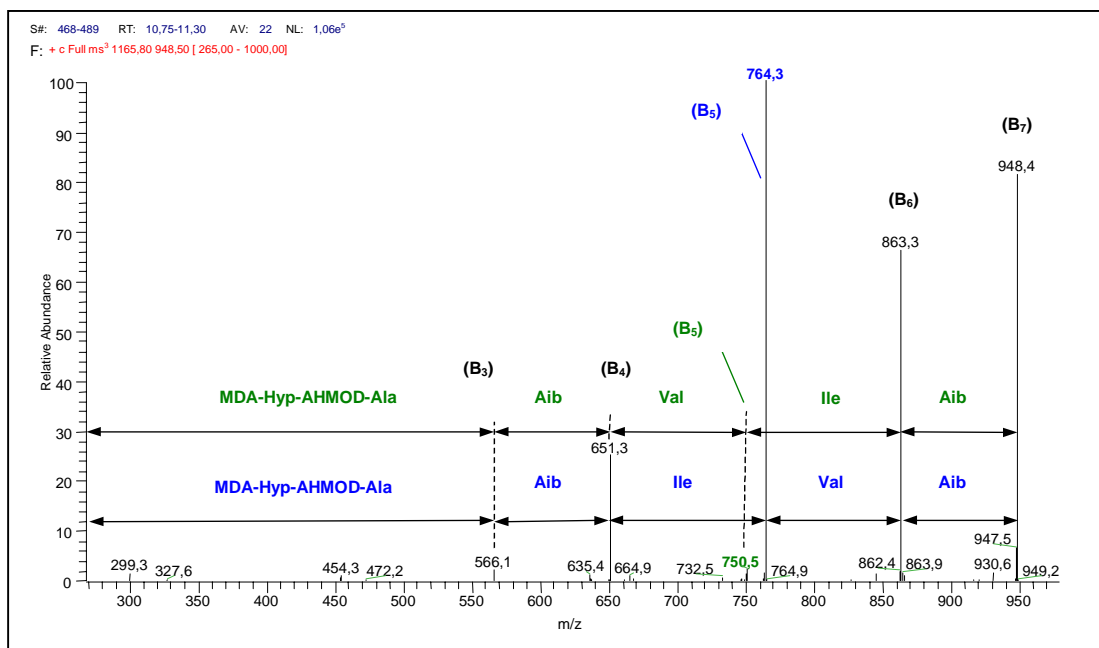
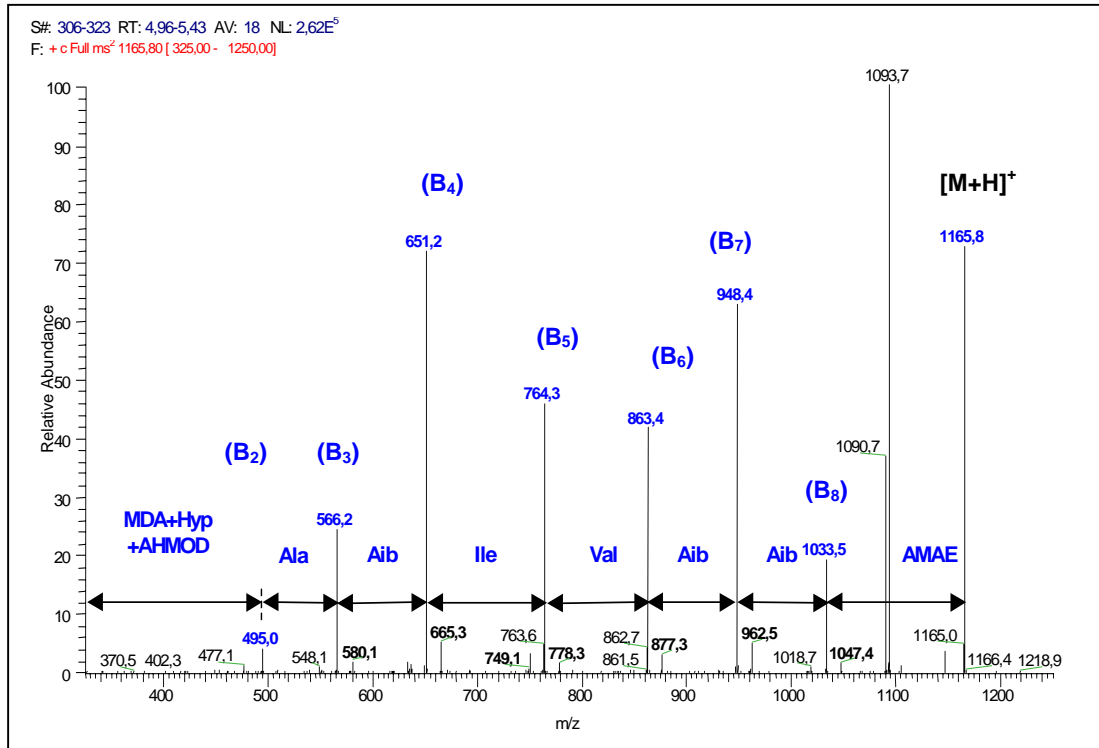
Der Vergleich der Ergebnisse der Präzisionsmassenbestimmung der [M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ionen der Roseoferine H und I mit den jeweils korrespondierenden Roseoferinen C und A ergab eine Differenz von  $m/z$  15,9962. Dieser Wert bestätigt das Vorhandensein eines zusätzlichen Sauerstoff-Atoms im Molekül.

Die genaue Masse des [M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ions mit  $m/z$  1152 konnte auf Grund von Überlagerungen mit den Isotopenpeaks des Quasi-Molekül-Ions der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> nicht durchgeführt werden. Der in **Tab. 16** angegebene berechnete Wert und die zugehörige Summenformel können jedoch auf Grund der Ergebnisse von ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS und ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup>-Untersuchungen als realistisch diskutiert werden, da offensichtliche Strukturhomologien vorliegen (siehe **Tab. 17**).

**Tab. 17:** Molmassen, Summenformeln und relative Intensität der drei [M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ionen der durch Zufütterung von L-4-Hydroxyprolin entstandenen Homologen des Roseoferin-Komplexes

Roseoferin	[M+H] <sup>+</sup> im HRESI-MS [ $m/z$ ]		Relative Intensität*	Summenformel
	gefunden	berechnet		
H	1179,8326	1179,8320	10	C <sub>60</sub> H <sub>111</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>
I	1165,8173	1165,8175	75	C <sub>59</sub> H <sub>109</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>
K	nicht bestimmbar	1151,8019	65	C <sub>58</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>

\*im Vergleich zum Quasi-Molekül-Ion der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> (= 100%)



**Abb. 18:** ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Roseoferin I-Quasi-Molekül-Ions (**oben**)

Erkennbar sind wiederum mehrere Reihen diagnostischer B-Typ-Fragment-Ionen, die durch Fettdruck hervorgehoben sind. Dies läßt auf die Existenz weiterer, jedoch nur partiell sequenzierbarer Minorkomponenten schließen. Die Sequenz der Hauptkomponente Roseoferin I<sub>1</sub> ist blau dargestellt.

ESI-Ion-Trap-MS<sup>3</sup>-Spektrum des diagnostischen MS<sup>2</sup>-Fragment-Ions B<sub>7</sub> mit *m/z* 948 (**unten**). Die Fragmentierung erfolgt analog Abb. 12 (**unten**).

Zur Positionsbestimmung des zusätzlichen Sauerstoff-Atoms im Molekül wurde auch das diagnostische MDA-Hyp-Fragment-Ion  $m/z$  282 mittels ESI-Ion-Trap-CID-MS<sup>n</sup> analysiert:

Die Fragmentierung dieses Ions mittels Quellen-CID lieferte ein das Tochterionen-Spektrum dominierendes Fragment mit  $m/z$  254 (**Abb. 20 oben, Spektrum (I)**), das in Analogie zum Fragmentierungsverhalten des [MDA-Pro]<sup>+</sup>-Fragments der Roseoferine A bis D<sub>1</sub> durch Abspaltung der CO-Gruppe entsteht. Ferner wurde ein Fragment mit  $m/z$  169 als Beweis für das Vorhandensein der MDA beobachtet sowie ein weiteres diagnostisches Fragment mit  $m/z$  86 (**Abb. 21, unten**). Die Genese des Fragments mit  $m/z$  86 wurde durch MS<sup>3</sup>-Stoßexperimente des MS<sup>2</sup>-Tochterions mit  $m/z$  254 bestätigt (**Abb. 21, unten**).

Ein unter gleichen Bedingungen aufgenommenes Quellen-CID-Spektrum des [MDA-Pro]<sup>+</sup>-Fragments der Roseoferine A bis D<sub>1</sub> wird durch das Ion der CO-Abspaltung mit  $m/z$  238 dominiert. MS<sup>3</sup>-Untersuchungen dieses Fragments lieferten ein Enkelion mit  $m/z$  70.

Dabei fällt auf, daß die Differenz dieser beiden unter gleichen Bedingungen entstandenen MS<sup>3</sup>-Enkelionen  $m/z$  16 beträgt. Daher unterstützt dieses Fragment ebenfalls die Lokalisierung des zusätzlichen Sauerstoff-Atoms innerhalb der Prolin-Einheit.

Diese Vermutungen wurden schließlich durch Aufnahme eines Tochterionenspektrums von L-4-Hydroxyprolin als Referenzsubstanz weiter bestätigt:

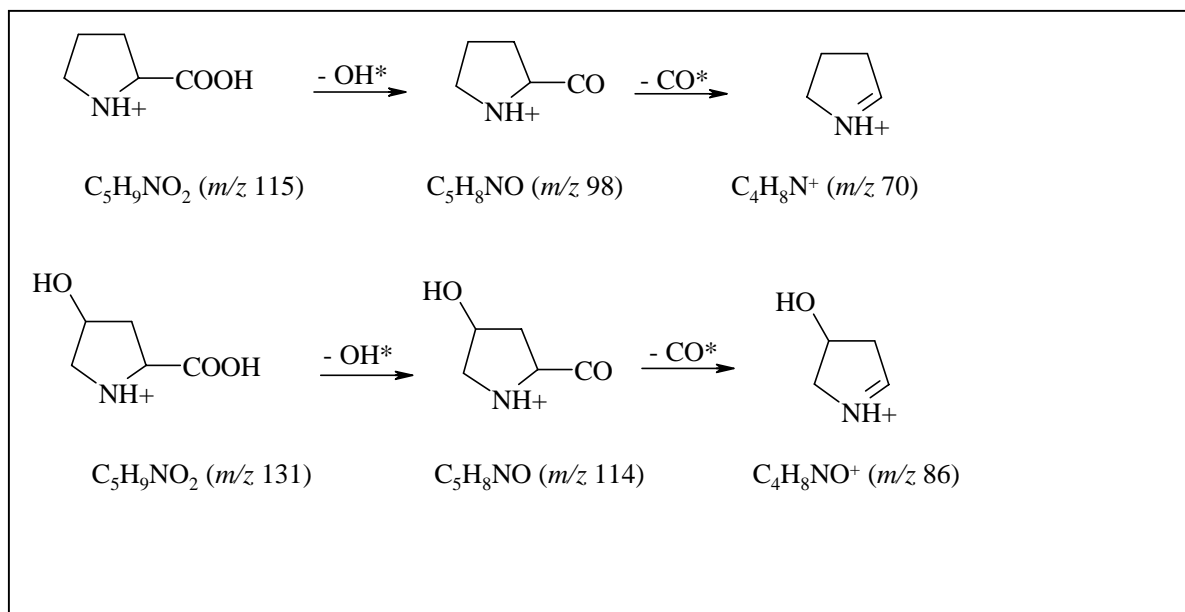
So lassen ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup>-Untersuchungen des [M+H]<sup>+</sup>-Ions bei  $m/z$  132 ein Fragment mit  $m/z$  114 erkennen, das infolge der Abspaltung von OH<sup>+</sup> aus dem Molpeak bei  $m/z$  131 entsteht. Durch die folgende Decarbonylierung entsteht hieraus das sehr intensive Fragment-Ion mit  $m/z$  86 (**Abb. 19, 20 und 21, unten**).

In Analogie hierzu fragmentiert L-Prolin wie folgt: ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup>-Untersuchungen des [M+H]<sup>+</sup>-Ions bei  $m/z$  116 ergaben ein Fragment mit  $m/z$  98, infolge der Abspaltung von OH<sup>+</sup> aus dem Molpeak mit  $m/z$  115. Dieses Fragment decarbonyliert offensichtlich fast quantitativ, und es entsteht hieraus das sehr intensive Fragment-Ion mit  $m/z$  70, das als typisch für in 2-Stellung substituierte Pyrrolidin-Derivate [HESSE *et al.*, 1995] angegeben wird (**Abb. 19, 20 und 21, oben**).

Auf Grund der offensichtlichen Homologien im Fragmentierungsverhalten des [MDA-Pro-CO]<sup>+</sup>-Fragments der Roseoferine A bis D<sub>1</sub> im ESI-Ion-Trap-Quellen-CID-MS<sup>3</sup> und des L-Prolins im ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup> lassen sich - in Analogie hierzu - folgende Schlüsse auf die Struktur der Roseoferine H, I und K ziehen:

Das  $MS^2$ -Fragment-Ion des L-4-Hydroxyprolins und das des  $[MDA-Hyp-CO]^+$ -Fragments entstehen in analoger Weise infolge einer Decarbonylierungs-Reaktion, da beide Ionen die gleiche, in **Abb. 19** dargestellte Struktur besitzen. Die durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen sprechen somit eindeutig für einen Einbau des zugesetzten Analogons bei kombinierter Fütterung von  $(NH_4)_2SO_4$  und L-4-Hydroxyprolin.

Der Einbau des L-4-Hydroxyprolins anstelle von L-Prolin zeigt an, daß auch der Peptidbiosynthese-Enzymkomplex von *Mycogone rosea* DSM 12973 ein breites Spektrum von Aminosäure-Substraten toleriert. Falls Kofermentationspartner solche strukturell veränderten und dadurch schwer metabolisierbaren Aminosäuren produzieren würden, könnten diese durch den Roseoferin-Bildner genutzt und damit die kofermentative Produktion neuer Metabolite realisiert werden.



**Abb. 19:** ESI-CID- $MS^2$ -Fragmentierung von L-Prolin (**oben**) und L-4-Hydroxyprolin (**unten**)

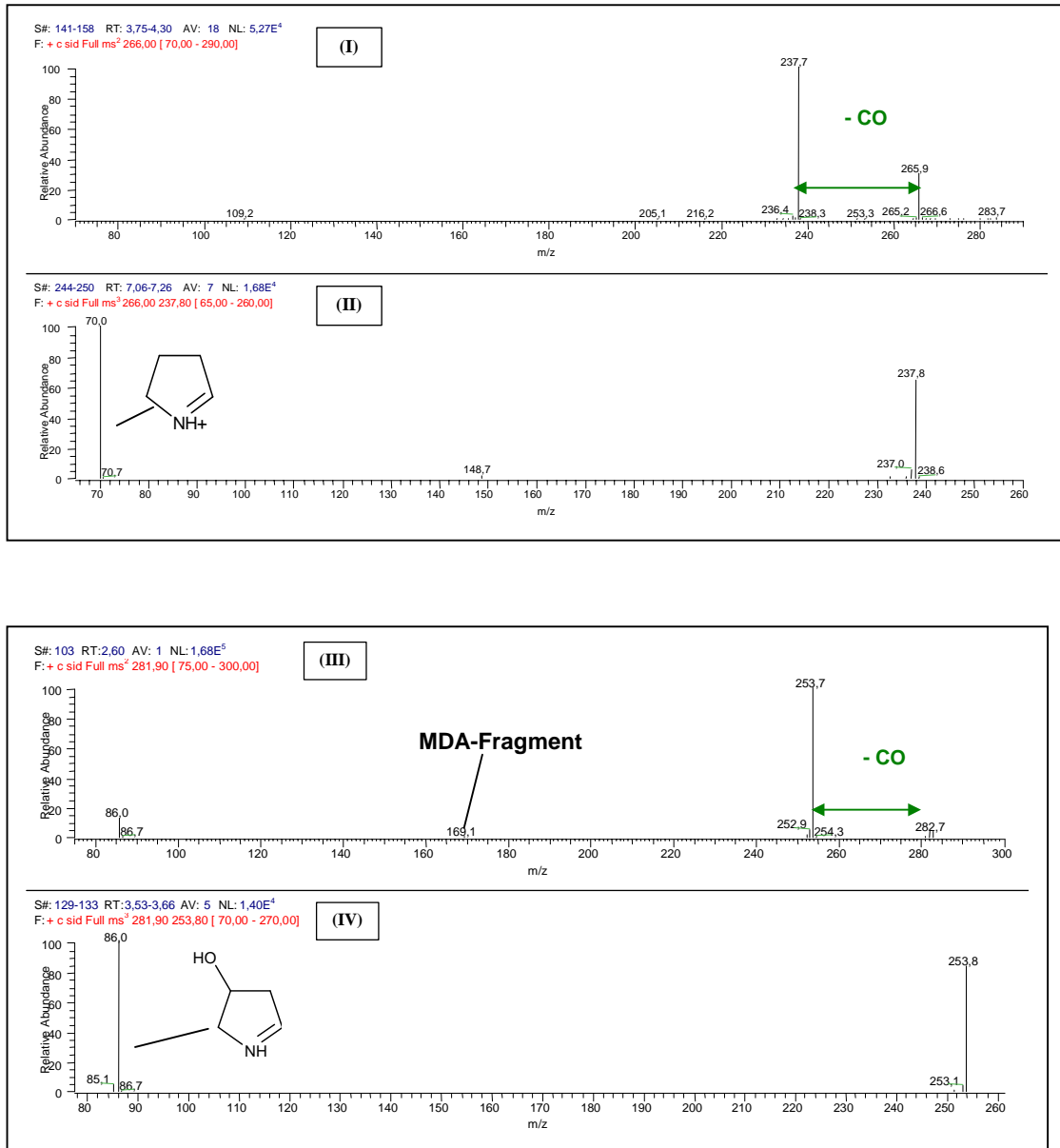
**Tab. 17:** Strukturen der Roseoferine H bis K aus Reinkulturen von *Mycogone rosea* DSM 12973 bei kombinierter Zufütterung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und L-4-Hydroxyprolin

a.) Sequenzen der Fett- und Aminosäuren der Einzelkomponenten

b.) Diagnostische B-Typ-Fragment-Ionen der Einzelkomponenten

Roseoferin	1	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
K <sub>1</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AAE
K <sub>2</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Ala	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AAE
K <sub>3</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Ala	Aib	Val	Val	Aib	Aib	AMAE
I <sub>1</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AMAE
I <sub>2</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Ala	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AMAE
H <sub>1</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Ala	Aib	Ile	Ile	Aib	Aib	AMAE
H <sub>2</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Ala	Val	Val	Ile	Aib	Aib	AMAE
H <sub>3</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Aib	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AMAE
H <sub>4</sub>	MDA	Hyp	AHMOD	Aib	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AMAE

Roseoferin	1	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
K <sub>1</sub>	168	282	495	566	651	764	863	948	1033	1152
K <sub>2</sub>	168	282	495	566	651	764	877	948	1033	1152
K <sub>3</sub>	168	282	495	566	651	750	849	934	1019	1152
I <sub>1</sub>	168	282	495	566	651	764	863	948	1033	1166
I <sub>2</sub>	168	282	495	566	651	750	863	948	1033	1166
H <sub>1</sub>	168	282	495	566	651	764	877	962	1047	1180
H <sub>2</sub>	168	282	495	566	665	764	877	962	1047	1180
H <sub>3</sub>	168	282	495	580	665	778	877	962	1047	1180
H <sub>4</sub>	168	282	495	580	665	764	877	962	1047	1180

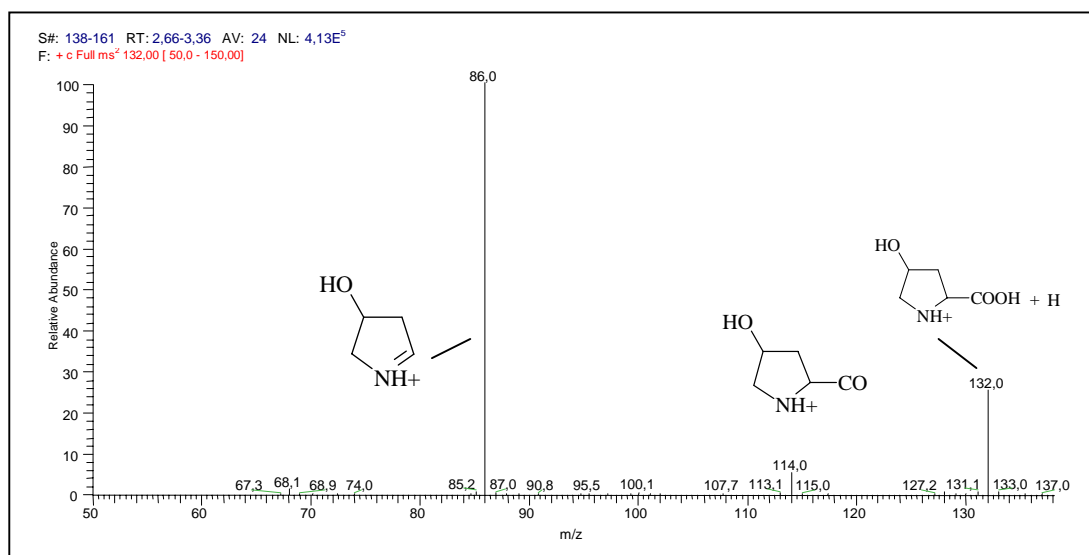
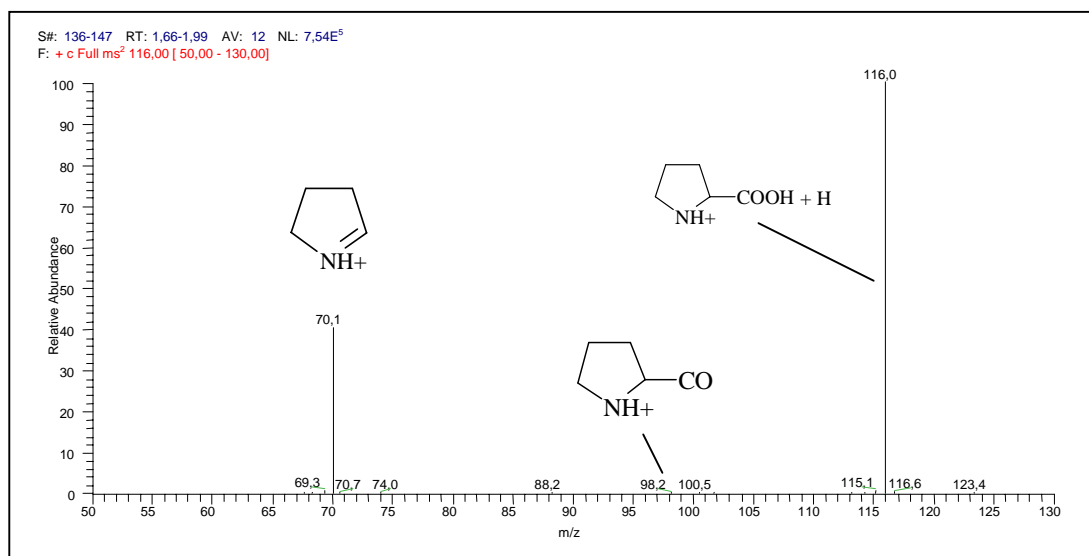


**Abb 20:** ESI-Ion-Trap-Quellen-CID-MS<sup>2</sup> von  $m/z$  266 (I) und MS<sup>3</sup> des diagnostischen MS<sup>2</sup>-Fragment-Ions bei  $m/z$  238 (II) der Roseoferin A bis G (**oben**)

Im Spektrum dargestellt ist die Strukturformel des diagnostischen L-Prolin-Fragments mit  $m/z$  70.

ESI-Ion-Trap-Quellen-CID-MS<sup>2</sup> von  $m/z$  282 (III) und MS<sup>3</sup> des diagnostischen MS<sup>2</sup>-Fragment-Ions bei  $m/z$  254 (IV) der Roseoferin H bis K (**unten**)

Im Spektrum dargestellt ist die Strukturformel des diagnostischen L-4-Hydroxyprolin-Fragments mit  $m/z$  86. Bei  $m/z$  169 ist das B-Typ-Fragment-Ion der MDA erkennbar.



**Abb. 21:** ESI<sup>+</sup>-Ion-Trap-MS<sup>2</sup> von L-4-Hydroxyprolin (**unten**) und L-Prolin (**oben**)

Die Ionen bei  $m/z$  70 (oben) bzw.  $m/z$  86 (unten) entsprechen den Pro- bzw. Hyp-Bruchstücken, die bei der MS<sup>3</sup>-Fragmentierung der diagnostischen Ionen [MDA+Pro-CO]<sup>+</sup> mit  $m/z$  238 bzw. [MDA+Hyp-CO]<sup>+</sup> mit  $m/z$  254 (siehe **Abb. 20**) entstehen.



### 3.3. Ergebnisse der Kofermentation von *Mycogone rosea* DSM 12973 und *Macrolepiota procera* F050:

Da der Helioferin-Bildner *Mycogone rosea* DSM 8822 von einem befallenen Fruchtkörper des Riesenschirmpilzes *Macrolepiota procera* isoliert worden war [GRÄFE *et al.*, 1995], wurde ein Vertreter dieser Species als Kofermentationspartner für den Roseoferin-Bildner ausgewählt. Bei Kokultur von *Mycogone rosea* DSM 12973 mit *Macrolepiota procera* F 050 konnte massenspektrometrisch keine qualitative Veränderung des Roseoferin-Komplexes nachgewiesen werden. Bei Anzucht der Kokulturen auf Malzagar-Platten bei 24°C gleicht das nach einer Kokulturdauer von 14 bzw. 21 Tagen gebildete Spektrum der Roseoferine dem einer unter gleichen Bedingungen gewachsenen Reinkultur von *Mycogone rosea* DSM 12973. Ein Auftreten zusätzlicher diagnostischer Peaks im ESI<sup>+</sup>-MS wurde nicht beobachtet. Gleiche Ergebnisse wurden nach 18tägiger Kokulturdauer bei einer Temperatur von 24°C auf Wb 6-1/14 mit bzw. Wb 6-1/14 ohne Zusatz von Spurenelementen erreicht sowie bei Verwendung von MSA und einer Temperatur von 21°C.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die bisherigen Untersuchungen zur Kofermentation von in der Natur vorkommenden Kombinationen aus Wirtspilz und mykophilem Partner keine Hinweise auf eine qualitative Veränderung des Sekundärmetabolitenspektrums im Vergleich zu den jeweiligen Reinkulturen erbrachten.

### 3.4. Kofermentation von *Mycogone rosea* DSM 12973 und *Acremomium spec.* Tbp-5:

#### 3.4.1. Auswahl des Stammes *Acremomium spec.* Tbp-5 als Kofermentationspartner:

Bei der folgenden systematischen Suche nach einem geeigneten Kofermentationspartner für *Mycogone rosea* DSM 12973 wurde von der Hypothese ausgegangen, daß bestimmte „Nicht-Wirtspilze“, die jedoch strukturell ähnliche, zur gleichen Verbindungsklasse gehörende Sekundärmetabolite produzieren, auf Grund der Homologie ihrer Biosynthese-Enzyme prinzipiell für eine Kofermentation geeignet sein müßten.

Der Stamm *Acremomium spec.* Tbp-5 wurde als Endophyt aus der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) isoliert und als Produzent eines Gemisches der Leucinostatine A, B und K beschrieben [STROBEL *et al.*, 1997]. Neben diesen drei bereits bekannten, in ihrer Struktur aufgeklärten Lipoaminopeptiden [FUKUSHIMA *et al.*, 1983; MORI *et al.*, 1983; RADICS *et*

*al.*, 1987] wurde von STROBEL & HESS 1997 über die Bildung eines weiteren Leucinostatin-Derivats in Standkulturen von *Acremomyium spec.* Tbp-5, berichtet, das als Leucinostatin A- $\beta$ -O-di-glucosid identifiziert werden konnte:

Der Stamm bildet ein als Leucinostatin A-Glucosyltransferase charakterisiertes Enzym, das die beiden freien Hydroxyl-Gruppen des Leucinostatins A – am C<sub>6</sub> der AHMOD und die des L-threo- $\beta$ -Hydroxyleucins – zu glykosidieren vermag. Dieser Mechanismus dient dem Produzenten einerseits dazu, sich selbst und seinen Wirt *Taxus baccata* vor der Toxizität des Leucinostatins zu schützen; andererseits wird eine potentielle Bedeutung für die Abwehr von Eiben-invadierenden Mikroorganismen diskutiert, die durch die Spaltung des Glykosids und Freisetzung des antibiotisch hochaktiven Leucinostatins A eliminiert werden [STROBEL & HESS., 1997]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Leucinostatins A mit den Antibiotika des Roseoferin-Helioferin-Komplexes wurde deren „*in-situ*-Biotransformation“, d. h. eine Glykosidierung an den beiden freien Hydroxylgruppen des Roseoferins am C<sub>6</sub> der AHMOD und am OH des terminalen AAE- bzw. AMAE-Rests (siehe **Abb. 9**), durch Kofermentation von *Mycogone rosea* DSM 12973 mit *Acremomyium spec.* Tbp-5 als potentielle Möglichkeit diskutiert [STROBEL, G.; persönliche Mitteilung 04/1999].

In der Literatur finden sich in zunehmendem Maße Berichte über die potentielle Bedeutung endophytischer Mikroorganismen als Quelle pharmakologisch hochaktiver Substanzen [STROBEL *et al.*, 1996; BUSH *et al.*, 1997; STROBEL & LONG, 1998; STROBEL *et al.*, 1999], so daß diese ökologische Gruppe von Mikroorganismen eine vielversprechende Ressource für die künftige Naturstoff-Forschung darstellten könnte.

### **3.4.2. Die Acremostatine A, B und C - Neue Lipoaminopeptide durch Kofermentation:**

Nach der Vorkultur von *Acremomyium spec.* Tbp-5 auf MID-Agar [PINKERTON *et al.*, 1976], der mit 1 g/l Bacto-Soytone versetzt worden war [STROBEL *et al.*, 1997], wurde der Stamm für drei Wochen bei 24°C und bei 21°C auf MID-Flüssigmedium mit Saccharose bzw. dem Äquivalent Maltose kultiviert. Die Substitution der Saccharose erfolgte auf Grund der beobachteten Repression der Roseoferin-Biosynthese bei Verwendung von Saccharose als einzige C-Quelle.

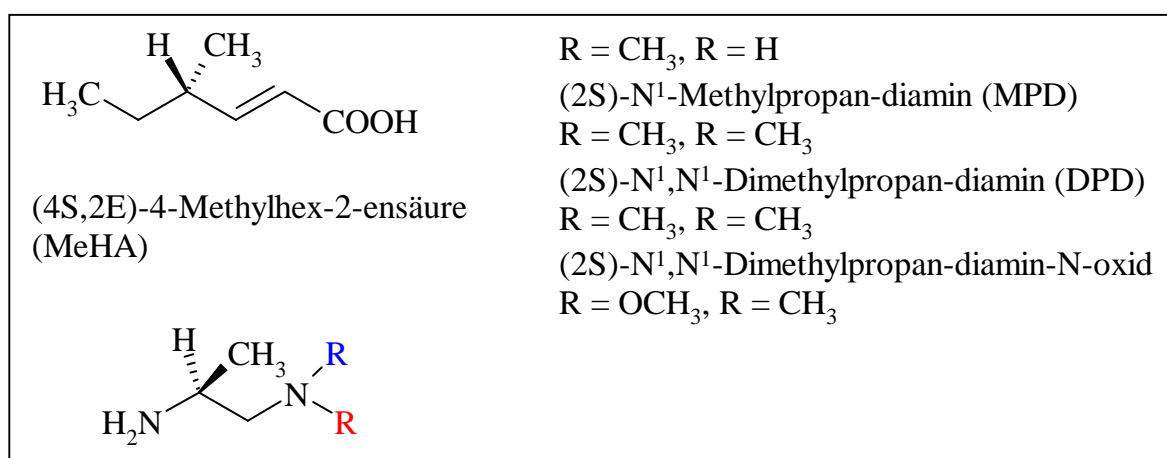
Die Extraktion des jeweils erhaltenen Mycels mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> belegte, daß das gebildete Leucinostatin fast quantitativ in die Kulturlösung ausgeschieden worden war, was durch Extraktion des Kulturfiltrats mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bestätigt werden konnte. Da im ESI<sup>+</sup>-Spektrum

dieses Extraktes jedoch lediglich ein Gemisch der Leucinostatine A, B und K detektiert werden konnte, wurden Mycel und Kulturfiltrat nach Entfernung des  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  noch jeweils zweimal mit n-Butanol extrahiert, um das eventuell vorhandene, wesentlich hydrophilere Leucinostatin A- $\alpha$ -O-di-glucosid zu gewinnen. Im  $\text{ESI}^+$ -Übersichtsspektrum dieser Extrakte wurde jedoch abermals nur ein Gemisch der Leucinostatine A, B und K detektiert. Eine zweite Wiederholung dieser Experimente bestätigte die Resultate der ersten Versuchsreihe.

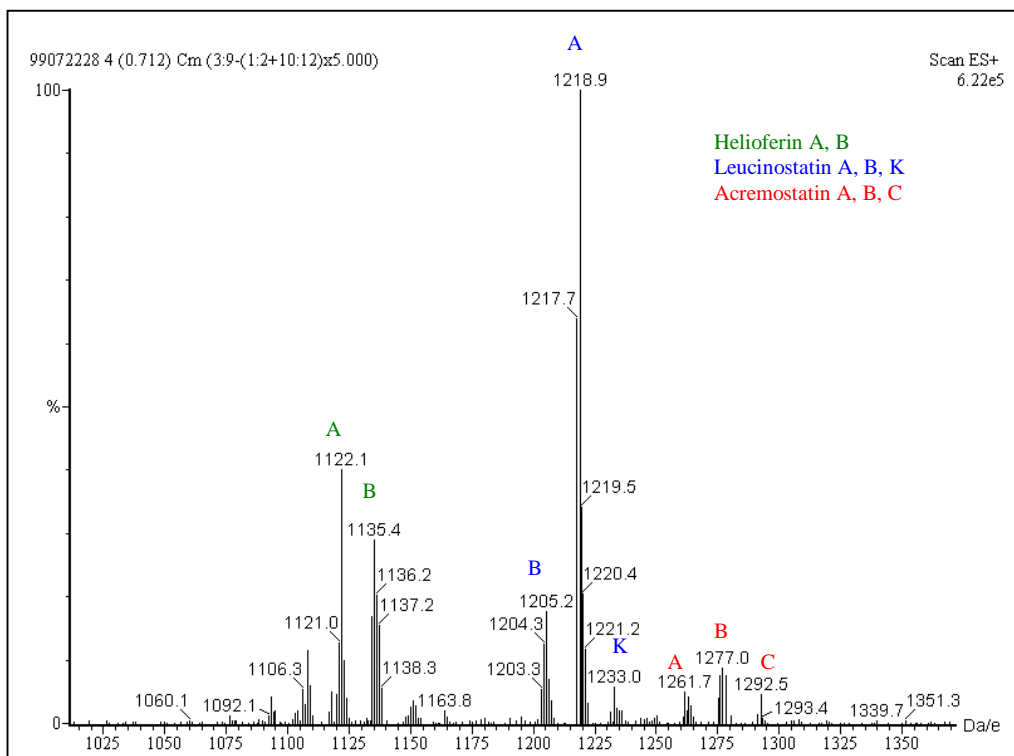
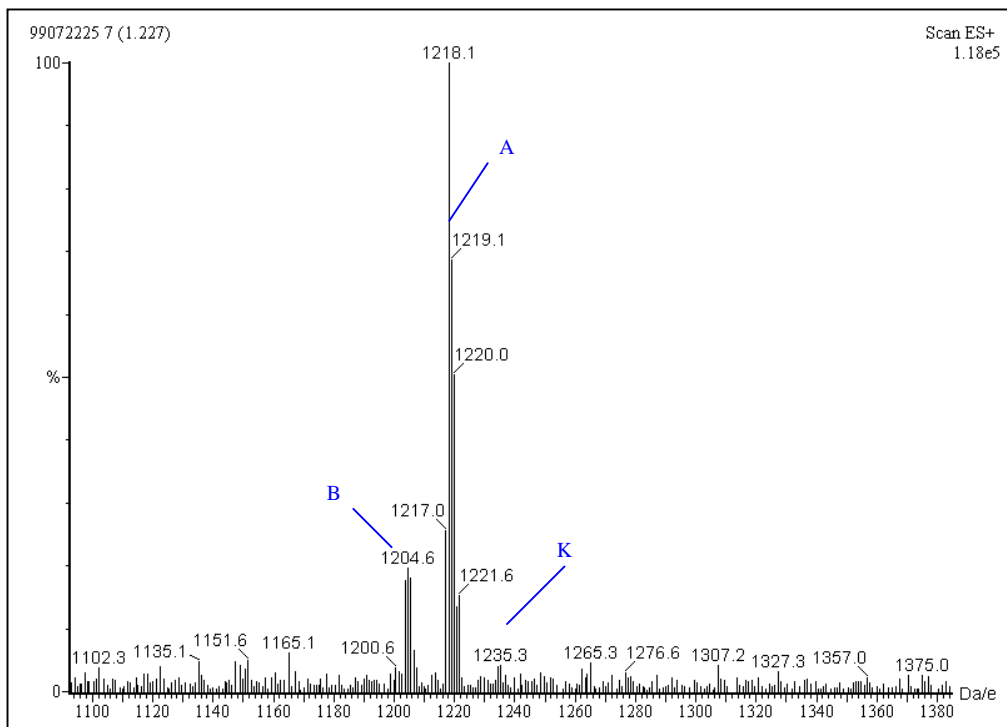
Aus diesem Grunde wurde *Acremomium spec. Tbp-5* auf Modifiziertem Synthetischen Agar (MSA), der mit 1 g/l Bacto-Soytone versetzt worden war, kultiviert. Da dieser Stamm etwas langsamer als *Mycogone rosea* DSM 12973 wächst, wurden die zur Kofermentation vorgesehenen Petrischalen nach Beimpfung mit *Acremomium spec. Tbp-5* für fünf bis sieben Tage vorkultiviert und erst danach mit dem Kofermentanten beimpft. Nach 14tägiger Kokultur-Dauer wurden die Plattenkulturen mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert:

Während bei der Analyse des Rohextrakts der Reinkultur von *Acremomium spec. Tbp-5* im  $\text{ESI}^+$ -MS nur das Gemisch der Leucinostatine A, B und K detektiert wurde (siehe **Abb. 23, oben**), konnte hingegen im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Rohextrakt der Kokultur das Auftreten bisher noch nicht beobachteter  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Quasi-Molekül-Ionen mit  $m/z$  1263,  $m/z$  1277 und  $m/z$  1294 registriert werden. Der qualitativ gleiche Effekt wurde in Reinkulturen von Tbp-5 bei Zusatz von 5 bzw. 20  $\mu\text{g/ml}$  Helioferin zum MSA beobachtet (siehe **Abb. 23, unten**).

Literatur- und On-Line-Datenbank-Recherchen ergaben erste Hinweise auf die potentielle Neuheit der gefundenen, als Acremostatine A, B und C bezeichneten neuen Minorkomponenten, deren Aminosäuresequenz durch die massenspektrometrische Analyse mittels HRESI-MS, ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS und ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup> bestätigt werden konnte.



**Abb. 22:** Strukturen der terminalen Fettsäure der Leucinostatine A, B und K sowie der C-terminalen Amine dieser Leucino- und der Acremostatine A, B und C



**Abb. 23:** ESI-Triple-Quadrupol-Spektrum einer Reinkultur von *Acromonium spec.* Tbp-5 auf MSA ohne Zusatz von Helioferin (**oben**) und bei Zusatz von 20 µg/ml Helioferin (**unten**)

Bei Zusatz von Helioferin zu Reinkulturen von *Acremomium spec.* Tbp-5 bzw. in Kokultur mit *Mycogone rosea* DSM 12973 kommt es zur Bildung strukturell modifizierter Lipoaminopeptide.

**Tab. 18:** Molmassen, Summenformeln und relative Intensität der drei  $[M+H]^+$ -

Quasi-Molekül-Ionen der durch Kofermentation von *Mycogone rosea* DSM 12973 mit *Acremomium spec.* Tbp-5 sowie infolge des Zusatzes von Helioferin zu Reinkulturen von Tbp-5 entstandenen Acremostatine A, B und C

Acremostatin	$[M+H]^+$ im HRESI-MS $[m/z]$		Relative Intensität*	Summenformel
	gefunden	berechnet		
A	1262,9066	1262,9067	6	$C_{65}H_{120}N_{11}O_{13}$
B	1276,9226	1276,9224	10	$C_{66}H_{122}N_{11}O_{13}$
C	1292,9204	1292,9173	4	$C_{66}H_{122}N_{11}O_{14}$

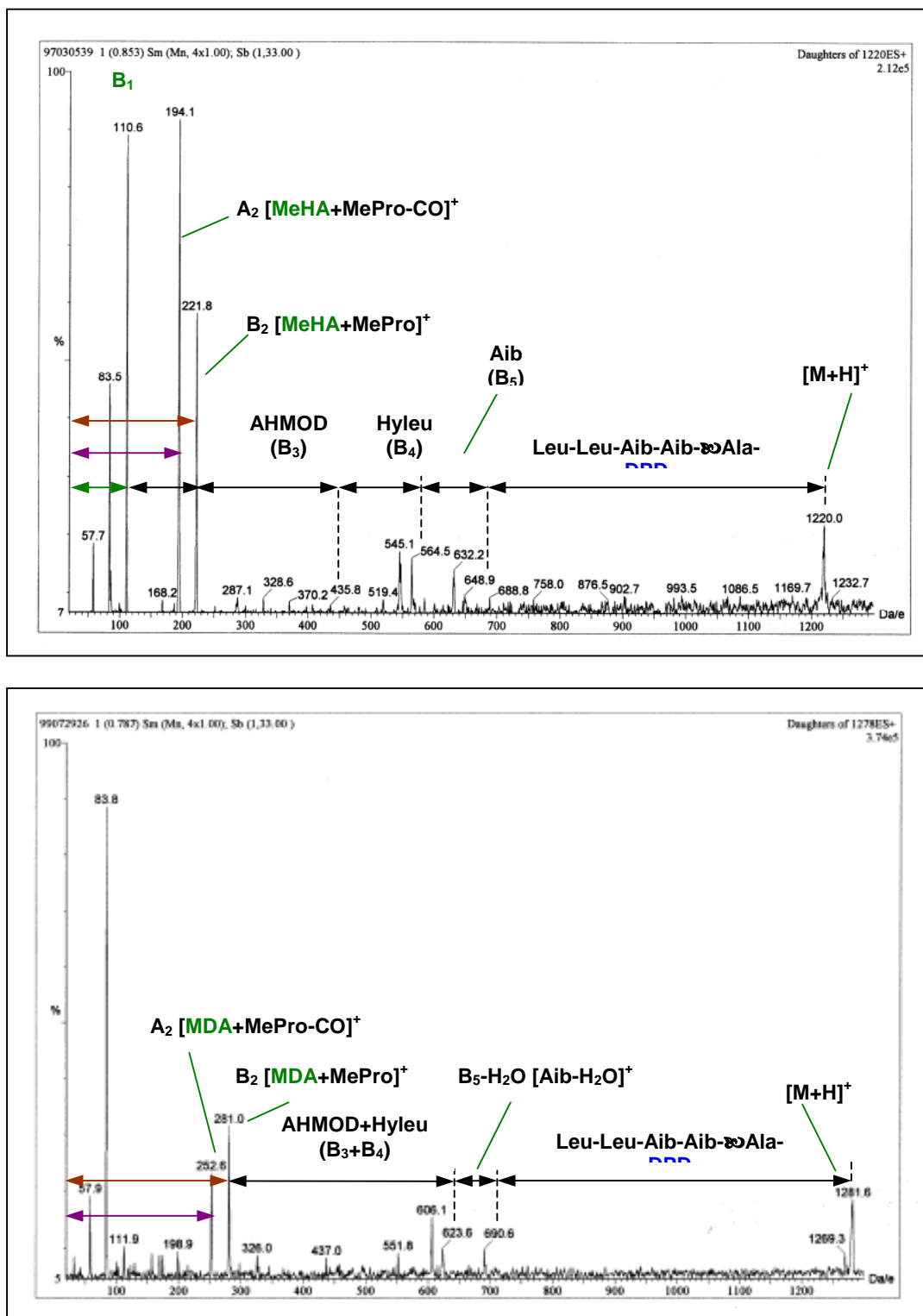
\*im Vergleich zum Quasi-Molekül-Ion des Leucinostatins A (= 100%)

Die vollständige Sequenzierung der Acremostatine A, B und C wurde durch Vergleich des jeweils korrespondierenden ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup>- bzw. ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS-Spektrums mit dem der entsprechenden Leucinostatine A, B und K erreicht (siehe **Tab. 19 und 20**):

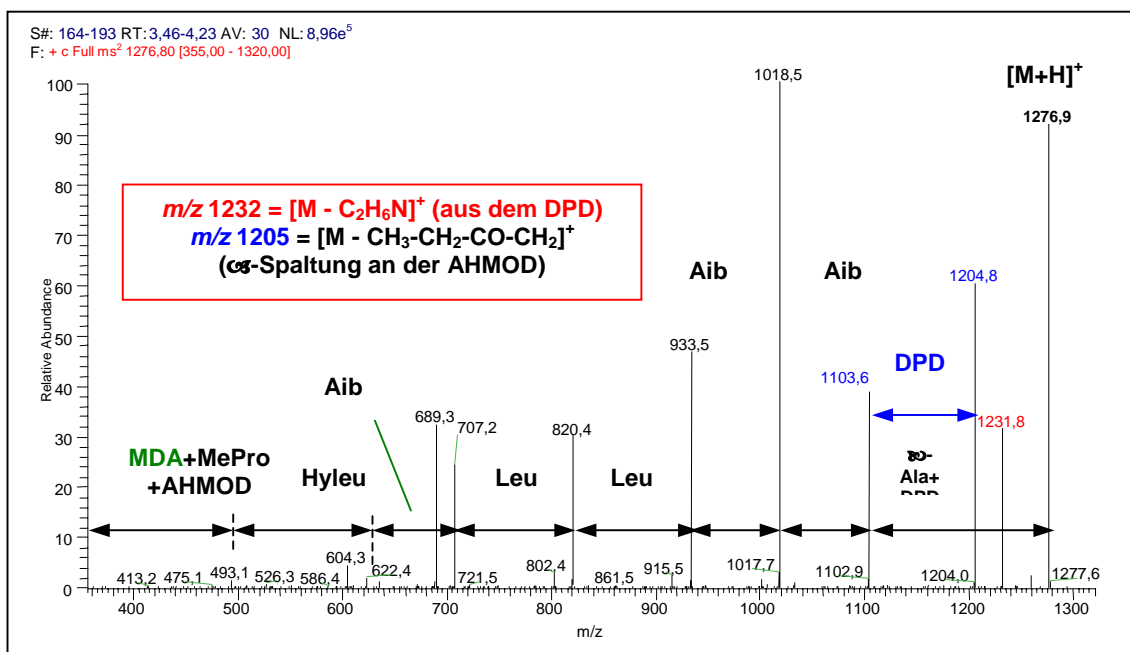
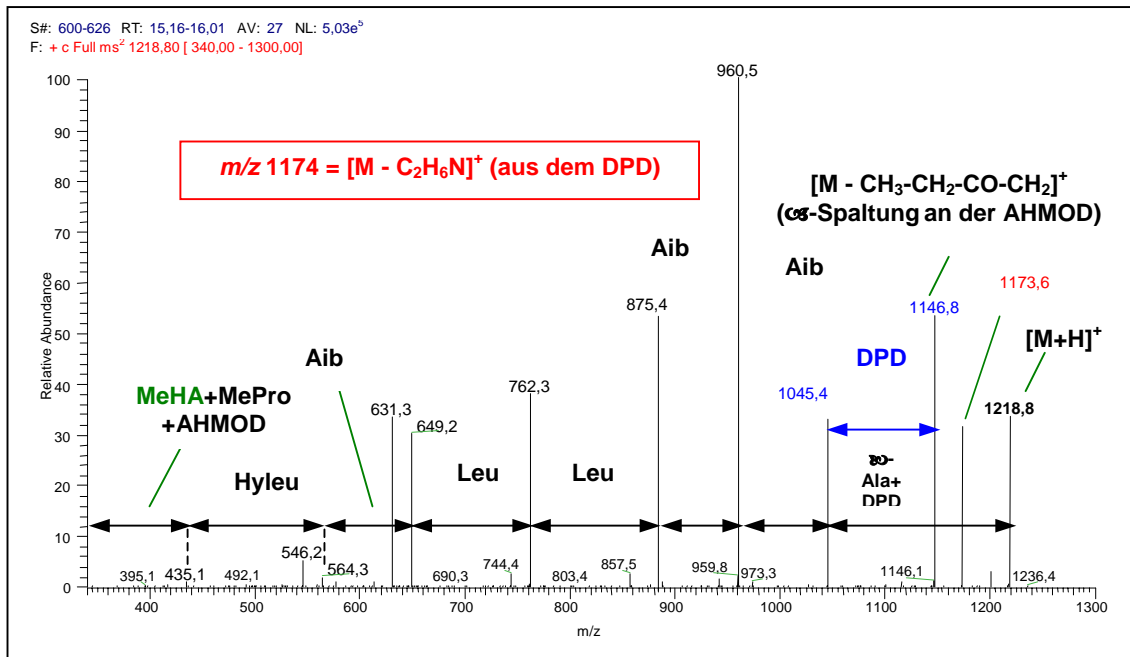
Das Molekulargewicht der jeweils korrespondierenden Leucino- und Acremostatine unterscheidet sich jeweils um 58 amu, entsprechend der Summenformel  $C_6H_{10}$ . Die Fragmentierung der Leucinostatine A, B und K im ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS und im ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup> bestätigte die A- und B-Typ-Spaltfragmente, welche mittels FAB-LC/MS-Kopplung ermittelt worden sind [ISOGAI *et al.*, 1992]. Die Fragmentierung des Leucinostatins A und des homologen Acremostatins B im ESI<sup>+</sup>-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS ist in **Abb. 24** dargestellt.

Es fällt auf, daß das diagnostische  $A_2$ -/B<sub>2</sub>-Ionenpaar  $m/z$  194 und  $m/z$  222 des Leucinostatins A, das durch Abspaltung des N-terminalen [(4S,2E)-4-Methylhex-2-ensäure - *cis*-4-Methyl-L-Prolin]-Rests entsteht, bei den Acremostatinen durch ein  $A_2$ -/B<sub>2</sub>-Ionenpaar bei  $m/z$  253 und  $m/z$  281 ersetzt ist. Die Isomerie von Leucino- und Acremostatinen ist daher entweder in Position 1 oder 2 der Peptidkette lokalisiert. Die Sequenz der Fragmente B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> und B<sub>5</sub> ist in beiden Verbindungsklassen identisch.

Aus diesen drei B-Typ-Fragmenten entstehen durch Wasserabspaltung zusätzlich Ionen mit  $m/z$  546 und  $m/z$  631 im Falle der Leucinostatine bzw. mit  $m/z$  604 und  $m/z$  690 bei den Acremostatinen. Die Intensität dieser Ionen ist teilweise größer als die der ursprünglichen B-Typ-Fragmente.



**Abb. 24:** ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS-Spektrum des Leucinoastatins A (**oben**) und des Acremostatins B (**unten**)



**Abb. 25:** ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Leucinostatins A (**oben**) und des Acremostatins B (**unten**)

Die Fragmentierung beider Verbindungen im ESI-MS verläuft nach denselben Prinzipien, die Massen der Fragment-Ionen sind jedoch um jeweils 58 amu versetzt. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen sprechen für eine Substitution der N-terminalen Fettsäure, d. h. einen Austausch der MeHA der Leucinostatine durch MDA in den Acremostatinen. Die teilweise sehr intensiven Fragmente  $[B_n - 18]^+$  entstehen durch eine Wasserabspaltung aus dem korrespondierenden Fragment  $B_n$ .

Die Strukturzuordnung der C-terminalen Fragment-Ionen erfolgte mittels ESI<sup>+</sup>-Ion-Trap-MS<sup>n</sup>-Untersuchungen. Die entsprechenden ESI<sup>+</sup>-Ion-Trap-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Acremostatins B (**unten**) und des homologen Leucinostatins A (**oben**) sind in **Abb. 25** dargestellt.

Durch die Überlappung dieser Spektren im Bereich von  $m/z$  340 bis 710 war eine zusätzliche Bestätigung der Struktur der Fragmente B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> und B<sub>5</sub>, möglich. Neben den diagnostischen Ionen B<sub>3</sub> bis B<sub>9</sub> traten – wie schon in den ESI<sup>+</sup>-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS-Spektren beobachtet - z. T. sehr intensive Fragmente auf, die durch eine Wasserabspaltung ( $m/z$  18) aus den entsprechenden B-Typ-Fragmenten entstehen (siehe z. B. **Abb. 25 unten** - Acremostatin B:  $m/z$  604 und 622; 689 und 707; 802 und 820 sowie 915 und 933). Wie im Falle der Roseoferine A bis K, ist auch bei den Leucino- und Acremostatinen ein Verlust der Seitenkette der AHMOD ( $m/z$  72) infolge einer  $\alpha$ -Spaltung zu verzeichnen, so daß aus dem [M+H]<sup>+</sup>-Ion die Fragment-Ionen bei  $m/z$  1147 (Leucinostatin A) und 1205 (Acremostatin B) entstehen. Das diagnostische Fragment-Ion bei  $m/z$  1174 bzw. 1232 entsteht durch Abspaltung des Ions C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sup>+</sup> (H<sub>2</sub>C=NH<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>) aus N,N-Dimethylamino-Derivaten [HESSE *et al.*, 1995], wie dem DPD (siehe **Abb. 25**).

**Tab. 19:** Fragmentierung der Leucinostatine A, B und K im ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS und im ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup> (B<sub>1</sub> bis B<sub>9</sub>)

Fragment-Ion [ $m/z$ ]											
B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O	B <sub>5</sub>	B <sub>5</sub> - H <sub>2</sub> O	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	B <sub>9</sub>
111	194	222	435	564	546	649	631	762	875	960	1045
Zuordnung der Fragmente											
MeHA		MePro	AHMOD	Hyleu		Aib		Leu	Leu	Aib	Aib

Die Fragmentierung der Acremostatine A, B und C erfolgte analog dem für die Leucinostatine A, B und K beschriebenen Schema; die Masse der Fragment-Ionen ist jedoch um  $m/z$  58 nach oben verschoben, wie aus den **Abb. 24 und 25** zu entnehmen ist.



**Tab. 20:** Fragmentierung der Acremostatine A, B und C im ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS und im ESI-Ion-Trap-MS<sup>2</sup> (B<sub>1</sub> bis B<sub>9</sub>)

Fragment-Ion [ <i>m/z</i> ]											
B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>4</sub> – H <sub>2</sub> O	B <sub>5</sub>	B <sub>5</sub> – H <sub>2</sub> O	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	B <sub>9</sub>
-	252	280	493	622	604	707	689	820	933	1018	1103
Zuordnung der Fragmente											
-		MePro	AHMOD	Hyleu		Aib		Leu	Leu	Aib	Aib

Ionen, die durch Verlust des C-terminalen Amins (siehe **Abb. 22**) entstehen, wurden erst aus dem diagnostischen [M- 72]<sup>+</sup>-Fragment generiert; im Falle des Leucinostatins A handelte es sich um *m/z* 1104 aus *m/z* 1205, und *m/z* 1046 entstand aus *m/z* 1147 beim Acremostatin B. Analoge Abspaltungen waren bei den übrigen Leucino- und Acremostatinen zu verzeichnen.

Mit Ausnahme der Leucinostatine L ([M+H]<sup>+</sup>-Ion *m/z* 1190) und T ([M+H]<sup>+</sup>-Ion *m/z* 1090), bei denen sich in Position 2 der Kette ein L-Prolyl-Rest befindet, tragen alle weiteren, bisher in der Literatur beschriebenen 20 Leucinostatine einen *cis*-4-Methyl-L-Prolyl-Rest (MePro) an dieser Stelle. Hinzu kommt, daß weitere strukturelle Modifikationen in dieser Position bisher noch nicht beschrieben worden sind [ISOGAI *et al.*, 1992]. Die Quasi-Molekül-Ionen der Leucinostatine L oder T konnten in den untersuchten Rein – und Kulturen von *Acremomium spec.* Tbp-5 nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen sprechen für die Substitution des Fettsäure-Rests in Position 1 der Leucinostatine. Die durch Präzisionsmassenbestimmung der [M+H]<sup>+</sup>-Ionen bewiesene Differenz von *m/z* 58 (↖ m C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>) belegt zudem für einen Austausch der den N-Terminus aller in der Literatur beschriebenen Leucinostatine blockierenden (4*S*,2*E*)-4-Methylhex-2-ensäure (MeHA) durch die in den Roseoferinen A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G vorhandene MDA., so daß für die Acremostatine folgende Sequenzen vorgeschlagen werden:

**(Leucinostatin A):** MeHA-MePro-AHMOD-Hyleu-Aib-Leu-Leu-Aib-Aib-↗Ala-MPD

**(Leucinostatin B):** MeHA-MePro-AHMOD-Hyleu-Aib-Leu-Leu-Aib-Aib-↗Ala-DPD

**(Leucinostatin C):** MeHA-MePro-AHMOD-Hyleu-Aib-Leu-Leu-Aib-Aib-↗Ala-DPD-N-oxid.

**(Acremostatin A):** MDA-MePro-AHMOD-Hyleu-Aib-Leu-Leu-Aib-Aib-↗Ala-MPD

**(Acremostatin B):** MDA-MePro-AHMOD-Hyleu-Aib-Leu-Leu-Aib-Aib-↗Ala-DPD

(Acremostatin C): MDA-MePro-AHMOD-Hyleu-Aib-Leu-Leu-Aib-Aib-~~8~~Ala-DPD-N-oxid.

### 3.4.3. Ist *Acremomium spec.* Tbp-5 zu einer kofermentativen Umsetzung der Roseoferine befähigt ?:

In älteren Kokulturen von *Mycogone rosea* DSM 12973 und *Acremomium spec.* Tbp-5 auf Wb 6-1/14-Agar mit Spurenelementen sind neben den Quasi-Molekül-Ionen der Roseoferine sowie Spuren der Leucino- und Acremostatine mehrere Cluster von Quasi-Molekül-Ionen vorhanden, die sich jeweils um 14 amu unterscheiden. Das Ion-Trap-ESI<sup>+</sup>-Spektrum wird durch vier [M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ionen bei  $m/z$  573,  $m/z$  587,  $m/z$  601 und  $m/z$  614 dominiert. Daneben treten weitere diagnostische Fragment-Ionen bei  $m/z$  303,  $m/z$  402,  $m/z$  490,  $m/z$  674 und  $m/z$  688 auf (siehe **Abb. 26, oben**). Auf Grund der auffälligen Massendifferenz von 14 amu wurden diese Fragmente mittels ESI-Triple-Quadrupol-CID-MS/MS und ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup> analysiert. Die Vermutung, daß es sich hierbei um Spaltstücke des Roseoferin-Komplexes handeln könnte, wurde durch das Auftreten folgender intensiver B-Typ-Fragmente belegt (**Tab. 21** und **23** sowie **Abb. 26, unten**):

**Tab. 21:** Struktur der Roseoferin-Bruchstücke in älteren Kokulturen von *Mycogone rosea* DSM 12973 und *Acremomium spec.* Tbp-5

#### a.) Aminosäure-Sequenzen der diagnostischen B-Typ-Spaltfragmente

Ursprung aus dem Roseoferin	Fragment-Ion [ $m/z$ ]					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
C <sub>1</sub>	Aib	Ile	Ile	Aib	Aib	AMAE
A <sub>1</sub>	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AMAE
A <sub>2</sub>	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AMAE
B <sub>1</sub>	Aib	Val	Val	Aib	Aib	AAE
B <sub>2</sub>	Aib	Ile	Val	Aib	Aib	AMAE
B <sub>3</sub>	Aib	Val	Ile	Aib	Aib	AMAE
D <sub>1</sub>	Aib	Val	Val	Aib	Aib	AAE

## b.) Diagnostische B-Typ-Fragment-Ionen

Ursprung aus dem Roseoferin	Fragment-Ion [ $m/z$ ]					
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
C <sub>1</sub>	86	199	312	397	482	614
A <sub>1</sub>	86	199	298	383	468	600
A <sub>2</sub>	86	185	298	383	468	600
B <sub>1</sub>	86	185	284	369	454	586
B <sub>2</sub>	86	199	298	383	468	586
B <sub>3</sub>	86	185	298	383	468	586
D <sub>1</sub>	-	185	85	369	454	572

Diese Ergebnisse wurden durch HRESI-Untersuchungen der vier [M+H]<sup>+</sup>-Quasi-Molekül-Ionen bei  $m/z$  573,  $m/z$  587,  $m/z$  601 und  $m/z$  614 bestätigt (**Tab. 22**):

**Tab. 22:** Molmassen, Summenformeln und relative Intensität der vier dominierenden Quasi-Molekül-Ionen der diagnostischen B-Typ-Spaltfragmente in älteren Kokulturen von *Mycogone rosea* DSM 12973 und *Acremorium spec. Tbp-5*

Fragment-Ion [ $m/z$ ]	[M+H] <sup>+</sup> im HRESI-MS [ $m/z$ ]		Relative Intensität*	Summenformel
	gefunden	berechnet		
614	614,4638	614,4605	10	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>
600	600,4465	600,4449	100	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>
586	586,4324	586,4292	75	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>
572	572,4130	572,4136	10	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>

Die übrigen Fragment-Ionen wurden in gleicher Weise mittels ESI-Ion-Trap-MS<sup>n</sup> analysiert. Hierbei ergaben sich jedoch lediglich Partialsequenzen, welche die für das betreffende Fragment-Ion jeweils angegebene Struktur haben könnten. Eine Bestätigung dieser Strukturen mittels HRESI-MS war auf Grund der geringen zur Verfügung stehenden Probenmenge jedoch nicht möglich.

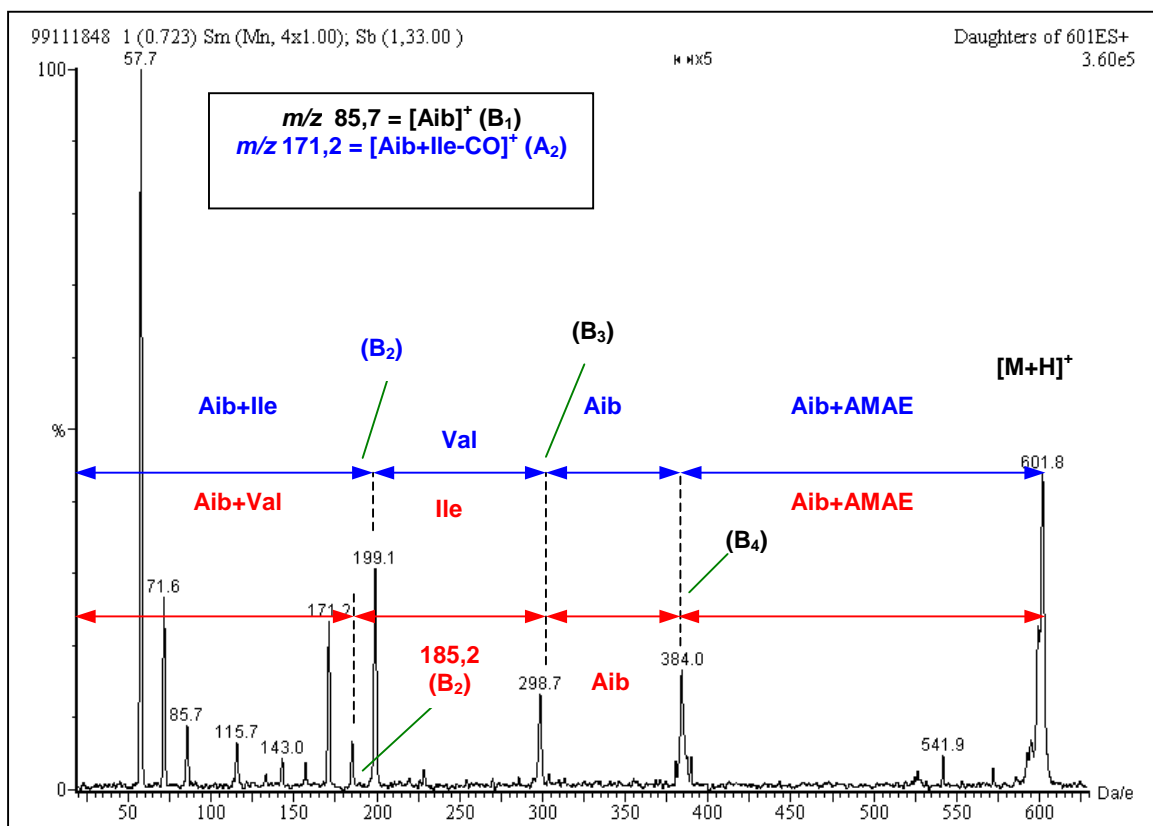
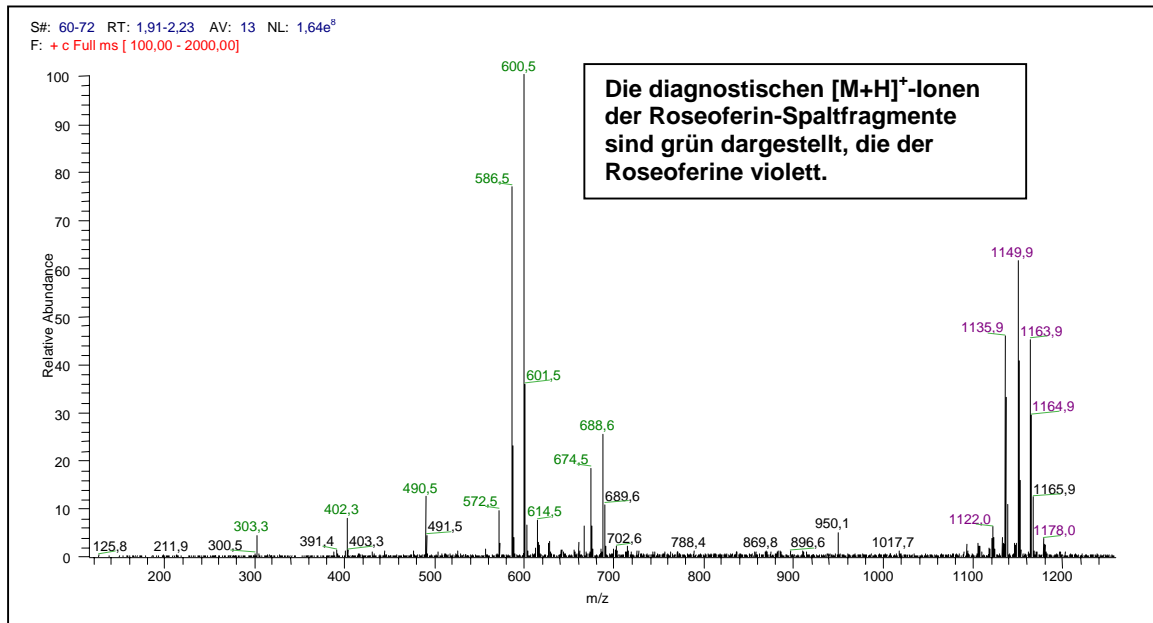
**Tab. 23:** Weitere diagnostischer Roseoferin-Spaltstücke in älteren Kokulturen von *Mycogone rosea* DSM 12973 und *Acremomium spec.* Tbp-5

Fragment-Ion [ $m/z$ ]	Zugeordnete Sequenz
303	-Aib-Aib-AMAE
402	-Val-Aib-Aib-AMAE
674	HO-Ala-Aib-Val-Val-Aib-Aib-AMAE
688	HO-Ala-Aib-Ile-Val-Aib-Aib-AMAE

Das Auftreten solcher diagnostischen Fragment-Ionen ist ebenso bei Kultivierung von Tbp-5 auf Wb 6-1/14 mit 1 g/l Helioferin als einziger N-Quelle beobachtet worden, jedoch ist die Intensität der Quasi-Molekül-Ionen für MS<sup>n</sup>- und HRESI-Untersuchungen in diesem Falle zu gering.

Um einen enzymatischen Ursprung der Fragment-Ionen-Cluster bei  $m/z$  573,  $m/z$  587,  $m/z$  601 und  $m/z$  614 zu beweisen, wurde die Modellsubstanz Helioferin mit Pronase umgesetzt. Hierbei traten die gleichen Fragment-Ionen-Cluster auf. Ihre Struktur wurde durch MS/MS-Untersuchungen der vier  $[M+H]^+$ -Quasi-Molekül-Ionen und der Identität dieser MS/MS-Fragmente mit den MS/MS-Spektren der in Kokultur auftretenden Roseoferin-Spaltstücken belegt. Diese Ergebnisse sind folgendermaßen zu interpretieren:

- Es kann davon ausgegangen werden, daß *Acremomium spec.* Tbp-5 zu einer enzymatischen Spaltung der Roseo- und Helioferine befähigt ist.
- Der Stamm baut anstelle der in den Leucinostatinen vorhandenen (4S,2E)-4-Methylhex-2-ensäure (MeHA) bei Kofermentation mit *Mycogone rosea* DSM 12973 die nach enzymatischer Spaltung der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G freigesetzte 2-Methyldecansäure (MDA) in die Peptidkette ein und erzeugt auf diese Weise neue chemische Strukturen, die Acremostatine.
- Die bei Spaltung des Helioferins bei in Reinkultur auf synthetischem, helioferinhaltigem Agar freigesetzte 2-Methyloctansäure fungiert als Vorstufe der MDA und wird von Tbp-5 offenbar zu dieser umgewandelt und in die Acremostatine eingebaut.



**Abb. 26:** ESI-Spektrum der diagnostischen Roseoferin-Spaltfragmente in älteren Kokulturen von *Mycogone rosea* DSM 12973 und *Acremonium spec.* Tbp-5 (**oben**) und ESI-CID-MS/MS (**unten**) des diagnostischen Fragment-Ions der Roseoferine  $A_1$  (**blau**) und  $A_2$  (**rot**) mit  $m/z$  601

#### 4. *Diskussion der Ergebnisse:*

##### 4.1. **Bietet die Kofermentation heterologer Mikroorganismen Chancen für die Entdeckung neuer Naturstoffe ?**

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation kann abgeleitet werden, daß für eine Kofermentation heterologer Mikroorganismen („kombinatorische Fermentation“) eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt sein muß:

- Die beteiligten Partner sollten unter gleichen experimentellen Bedingungen definierte, strukturell ähnliche Sekundärmetabolite produzieren, die analogen oder ähnlichen Biosynthese-Wegen, z.B. der Polyketid- oder/und der nicht-ribosomalen Peptidsynthese an Thiotemplaten, entstammen. Es ist davon auszugehen, daß die Biosynthese der Roseoferine und Acremostatine als neue Repräsentanten der Lipoaminopeptid-Antibiotika – wie im Falle anderer nicht-ribosomal gebildeter Peptide, wie z.B. den Cyclosporinen, Enniatinen [von DÖHREN & KLEINKAUF, 1999] und Ergopeptinen [WALZEL *et al.*, 1997] - über den sog. Thiotemplat-Mechanismus unter Katalyse multifunktionaler Peptidsynthetasen verläuft. Dafür spricht der Einbau ungewöhnlicher, nicht-proteinogener Aminosäure- und die Anwesenheit von Fettsäure- bzw. Lipoaminosäure-Resten in solchen Strukturen.
- Die Biosynthese-Enzyme der Kofermentationspartner sollten eine relative Unspezifität aufweisen, so daß auch strukturelle Varianten von Präkursoren als Substrate akzeptiert werden. Offenbar werden dabei jedoch nur solche strukturell veränderten Produkte gebildet, deren Bauplan mit dem der „Stammsubstanzen“ identisch ist. So wurden weder Produkte mit kürzerer, noch mit längerer Kette beobachtet. Dadurch wird gewährleistet, daß auch bei den strukturell modifizierten Varianten eines Naturstoffs die biologische Aktivität, d. h. die Paßfähigkeit für das natürliche Protein-Target, erhalten bleibt. Da jeweils nur eine limitierte Anzahl struktureller Modifikationen toleriert wird, ist von einer target-orientierten Evolution solcher Peptidbiosynthese-Wege auszugehen [KLEINKAUF & von DÖHREN, 1997].
- Es konnte gezeigt werden, daß *Acremomium spec.* Tbp-5, als Lipoaminopeptid-produzierender Pilz, die vom anderen Partner, *Mycogone rosea* DSM 12973, gebildeten Lipoaminopeptid-Antibiotika zu spalten vermag und bestimmte strukturell ähnliche Spaltprodukte in seine eigenen Lipoaminopeptide inkorporiert. Es ist davon auszugehen, daß diese Spaltung enzymatisch erfolgt, da die Struktur der in Kokultur nachgewiesenen mit den bei Spaltung von Helioferin durch Pronase entstehenden Fragmenten identisch ist.

Anstelle der in den Leucinostatinen vorhandenen (4S,2E)-4-Methylhex-2-ensäure (MeHA) baut *Acremomium spec.* Tbp-5 bei kombinatorischer Fermentation mit *Mycogone rosea* DSM 12973 die nach enzymatischer Spaltung der Roseoferine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G freigesetzte 2-Methyldecansäure (MDA) in die Peptidkette ein und erzeugt auf diese Weise neue chemische Strukturen, die Acremostatine. Die bei Spaltung des Helioferins bei in Reinkultur auf synthetischem, helioferinhaltigem Agar freigesetzte 2-Methyloctansäure (MOA) fungiert als Vorstufe der MDA und wird von Tbp-5 offenbar zu dieser umgewandelt und in die Acremostatine eingebaut.

Daraus kann gefolgert werden, daß die Kofermentation heterologer Mikroorganismen unter bestimmten, z. B. den o. g. Voraussetzungen, als eine Quelle neuer Naturstoffe geeignet ist.

#### **4.2. Kofermentation von Wirtspilz und Mykoparasit: Ist die Bildung neuer Naturstoffe prognostizierbar ?:**

Im Gegensatz zur Kofermentation von *Mycogone rosea* DSM 12973 und *Acremomium spec.* Tbp-5 konnten in den untersuchten Kombinationen aus Wirtspilz und Mykoparasit keine qualitativen Veränderungen des Produktspektrums registriert werden. Dies könnte eine Reihe von Ursachen haben:

- Die Enzyme des Sekundärstoffwechsels beider Partner waren nicht genügend kompatibel, um eine Modifikation definierter Leitmetabolite zu erreichen.
- Die physiologischen Bedingungen waren nicht adäquat: Die antagonistischen Potenzen eines Mykoparasiten werden vom aktuellen physiologischen Status bestimmt, so daß Veränderungen bestimmter physikochemischer (Ionenstärke und Azidität des Mediums) und/oder nutritiver Parameter (Bioverfügbarkeit bestimmter Nährstoffe, wie Vitamine und Spurenelemente) maßgeblich die Nutzung definierter Ressourcen beeinflussen. Die Limitation bestimmter Nährstoffe könnte daher als ein entscheidendes Kriterium für die aktuelle trophische Beziehung zwischen einem Wirtspilz und seinem nicht obligat parasitischen Gegenspieler diskutiert werden. Diese Vermutung wird durch eine Reihe von Beobachtungen unterstützt: So ist bekannt, daß verschiedene nekrotrophe Mykoparasiten mit relativ breitem Wirtsspektrum, wie *Gliocladium virens*, *Trichoderma harzianum* u. a., in rein saprophytischer Assoziation mit anderen Pilzen zu wachsen vermögen [JEFFRIES, 1995]. Eine Infektion mit *Sepedonium chrysospermum* führt – unabhängig von der taxonomischen Einordnung des befallenen Wirtspilzes - stets zur

vollständigen Nekrose der betroffenen Zellen. Wenn jedoch Pilze, wie *Botrytis cinerea* oder *Trichothecium roseum*, Fruchtkörper, die bereits von *Sepedonium chrysospermum* befallen worden sind, invadieren, kann dieses biotroph in den Zellen dieser sekundären Parasiten wachsen [RUDAKOV, 1978]. Der alleinige Nachweis eines taxonomisch definierten Mykoparasiten an einem bestimmten Wirtspilz sagt noch nichts über die Häufigkeit dieses Phänomens *in natura* sowie die Art der trophischen Interaktion zwischen beiden Partnern aus. So listet HELFER [1991] insgesamt 50 Arten von Wirtspilzen auf, für die in der Literatur ein Befall mit *Hypomyces chrysospermus* beschrieben worden ist, verweist jedoch gleichzeitig darauf, daß es sich bei einem Teil der Belege um Einzelbeschreibungen bzw. Ausnahmefälle handelt oder handeln könnte. Diese Einschränkung ist bei der Auswahl zu untersuchender Wirt-Mykoparasit-Kombinationen zu berücksichtigen.

- Bei Untersuchungen zur Kofermentation ist das Alter der untersuchten Stammissolate zu berücksichtigen: Obwohl der hier bearbeitete Stamm von *Mycogone cervina* Dittmar die typischen morphologischen Charakteristika dieser Art [ARNOLD, 1969] – einschließlich des durchdringenden erdigen, an Streptomyceten erinnernden Geruchs [ARNOLD, G. R. W.; persönliche Mitteilung 10/1995] – aufwies, ist eine Degeneration bestimmter biologischer Aktivitäten nach der dreißigjährigen Aufbewahrung in einer Stammsammlung nicht auszuschließen. So konnte in Kulturen von *Mycogone cervina* CBS 465.67 keine antibiotische Aktivität gefunden werden, während RUDAKOV [1978] über die Bildung antifungaler Metabolite in Submerskulturen von verschiedener Stämme von *M. cervina* und der ebenfalls auf Helvellaceen parasitierenden, sehr nahe verwandten *M. ochracea* Boud. berichtet.
- Hinzu kommt, daß die Virulenz des jeweils untersuchten Isolats eines Mykoparasiten für Wirtspilze einer bestimmten Art sehr unterschiedlich sein kann [FLETCHER *et al.*, 1995]: Während im Falle dreier langsamer wachsender Isolate von *M. perniciosia* elektronenmikroskopisch ein hoher Gehalt an virusähnlichen Partikeln nachgewiesen wurde, konnten im Falle zweier schnellwüchsiger Stämme keine solchen Strukturen beobachtet werden. Das Vorhandensein dieser Partikel verursachte jedoch eine signifikante Erhöhung der Virulenz des betreffenden Isolats und führte dazu, daß - bedingt durch Infektion der Fruchtkörper-Primordien - entweder sklerotisierte Fruchtkörper gebildet werden oder sklerotisierte Areale an den Hüten von *A. bisporus* nachgewiesen wurden. Eine Infektion von *A. bisporus* mit virusfreien Isolaten verursachte hingegen signifikant niedrigere Ertragsverluste, und es wurden kaum sklerotisierte Fruchtkörper,



sondern lediglich Zonen braunen nekrotischen Gewebes an den Hüten - ähnlich wie bei einem Befall mit *M. rosea* - beobachtet.

- Ein weiteres entscheidendes Kriterium stellt die Übertragbarkeit von *in-vitro*-Untersuchungen auf die Verhältnisse am natürlichen Standort dar: Während *Mycogone pernicioso* als destruktiver Mykoparasit in Kulturen von *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach [syn. *A. brunnescens* Peck.] beschrieben ist, konnten morphologische Veränderungen, oder gar eine Infektion des Wirtsmycels in Kokulturen, nicht beobachtet werden. Der Parasit wurde sogar vom Mycel des Wirtspilzes überwachsen; und eine ähnliche Reaktion wurde in Kokulturen von *Mycogone psilocybina* Morgan-Jones et Gray mit ihrem *in natura* befallenen Wirt *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer beschrieben. Bei Kokultur von *Mycogone rosea* bzw. *Mycogone psilocybina* und *Agaricus brunnescens* wurden lediglich ein partielles Überwachsen des Wirtspilzes, verbunden mit bräunlicher Verfärbung und verstärkter Tuffbildung; jedoch keine nekrotischen Veränderungen des Wirtsmycels registriert [GRAY & MORGAN-JONES, 1981]. Diese Ergebnisse stimmen mit eigenen Beobachtungen an Kokulturen von *Macrolepiota procera* F 050 und *Mycogone rosea* DSM 12973 überein. Diese Phänomene könnten folgendermaßen interpretiert werden: Eine Reihe von Mykoparasiten ist offenbar in der Lage, unter bestimmten Bedingungen zwischen Mycel und Fruchtkörper des Wirtspilzes zu unterscheiden, wobei die biologisch-chemischen Grundlagen dieser Erkennungsreaktion noch nicht geklärt sind. Während der Fruchtkörper bei Befall mit *M. rosea* oder *M. pernicioso* mehr oder minder stark zerstört wird und dem Mykoparasiten schließlich als Nahrungsquelle dient [FLETCHER *et al.*, 1995], wird über einen Befall des Mycels nicht berichtet. RUDAKOV [1978] und HAWKSWORTH [1981] erwähnen hingegen die Fähigkeit von *Mycogone* zu intrazellulären biotrophem Wachstum in Hyphen bestimmter Wirtspilze. Die Fähigkeit bestimmter Mykoparasiten, unter definierten Bedingungen nur ausgewählte morphologische Strukturen befallen zu können, wäre somit als ein im Laufe der Evolution erworbener Vorteil zu diskutieren. Der Nutzen einer solchen adaptiven Spezialisierung ist offensichtlich; denn das Überleben des Wirtsmycels stellt in vielen Fällen eine unbedingte Voraussetzung für die Fortdauer der mykoparasitischen Interaktion dar. Die Zerstörung des Mycels käme daher einer Vernichtung der Grundlage für die eigene Existenz des Mykoparasiten gleich [GRAY & MORGAN-JONES, 1981]. Die beobachtete Interaktion von *Macrolepiota procera* mit *Mycogone rosea* ist als rein kommensalistisch zu bewerten. Dies könnte einerseits durch die Verwendung eines komplexen oder chemisch definierten Vollmediums bedingt worden sein; andererseits

durch eine schon diskutierte – eventuelle - Präferenz des Parasiten für Fruchtkörper dieses Wirts, ohne dabei das Mycel zu schädigen. Die meisten Wirtspilze von Mykoparasiten sind jedoch unter Laborbedingungen nicht zur Fruktifikation anzuregen, so daß diese Tatsache einen entscheidenden limitierenden Faktor für die Realisierung einer den Bedingungen am natürlichen Standort näherkommenden Kofermentation dieser Organismen darstellt.

Eine Alternative zur Vermeidung dieses Problems wären Kofermentationen von *Mycogone rosea* mit solchen Wirtspilzen, die unter Laborbedingungen zur Ausbildung von Fruchtkörpern anregbar wären. Diese sind jedoch chemisch weitgehend charakterisiert (*Agaricus spec.*). Andere Wirte, wie *Amanita spec.* und *Boletus spec.*, erscheinen für biotechnologisch-naturstoffchemische Untersuchungen auf Grund des sehr langsamen, teilweise sogar schlechten Wachstums in Kultur und des Unvermögens zur Fruchtkörperbildung als ungeeignet.

Die diskutierten Sachverhalte illustrieren die offensichtlichen Schwierigkeiten in der Auswahl von geeigneten Pärchen aus Wirtspilz und Mykoparasit zur Kofermentation. Eine weitere, detailliertere Bearbeitung des Phänomens „Mykoparasitismus“ mit dem Ziel der Isolierung neuer Naturstoffe aus Kokulturen wäre nur durch ein umfangreiches Screeningprogramm unter Verwendung von Agarkulturen in Petrischalen möglich, wobei sowohl morphologische als auch Veränderungen im Spektrum der gebildeten Sekundärmetabolite erfaßt werden müßten. Ein weiteres in diesem Zusammenhang zu lösendes Problem stellen jedoch die oftmals sehr komplexen Ansprüche vieler Mykoparasiten an das verwendete Nährmedium dar, so daß die Arbeit mit komplexen, qualitativ und quantitativ uneinheitlichen Zusätzen, wie Peptonen und Pflanzenmehlen, unumgänglich ist. Die Ausbildung charakteristischer, für die jeweilige mykoparasitische Species typischer morphologischer Strukturen ist in Kultur oftmals schon nach wenigen Passagen nicht mehr nachweisbar. So sind einige biotrophe Mykoparasiten, wie *Gliocephalis hyalina*, *Gonatobotrym fuscum* und *Gonatorhodiella highlei*, in axenischer Kultur neben Thiamin, Biotin und Pyridoxalphosphat auf das Mykotrophein, einen Wachsfaktor mit noch unbekannter chemischer Struktur, der von den jeweiligen Wirtspilzen biosynthetisiert wird, angewiesen [GAMS *et al.*, 1999].

Diese Ausführungen verdeutlichen einerseits die Schwierigkeiten der Arbeit mit Kokulturen von Mykoparasiten und ihren Wirtspilzen, weisen jedoch zugleich auf das Potential dieser in biotechnologisch-naturstoffchemischer Hinsicht bisher kaum bearbeiteten Gruppe von Mikroorganismen hin.

Obwohl in dieser Arbeit durch Kofermentation von Wirtspilz und Mykoparasit keine neuen Naturstoffe erhalten werden konnten, beweisen die mit *Acremomium spec. Tbp-5* erzielten Ergebnisse die prinzipiellen Möglichkeiten dieser Methode. Wenn man die Vielzahl mykoparasitischer Species berücksichtigt, deren Sekundärmetabolit-Spektrum in Rein- bzw. Kokultur mit Wirtspilzen bisher noch nicht untersucht worden ist, kann man das Auftreten geeigneter Kombinationen mit „kobiosynthetisch“ verändertem Sekundärmetabolitspektrum nicht ausschließen. Besonders unter fakultativ sowie obligat biotrophen Parasiten finden sich interessante morphologische Phänomene, die mit der Bildung bestimmter Sekundärmetabolite in Gegenwart eines Wirtspilzes assoziiert werden könnten und deren Ursache regulatorisch wirksamen Sekundärmetaboliten zugeschrieben werden könnte:

Z. B. werden Wachstum und Pycnidienbildung von *Hyalopycnis blephariostoma* (Berk.) Seeler, der Anamorphe von *Heterogastridium pycnidioideum* Oberwinkler et Bauer, in Kokultur mit dem Parasiten, *Plectosporium tabacinum* (van Beyma) M. E. Palm, W. Gams et Nirenberg, gefördert, während der Wirt in Reinkultur sehr langsam wächst und Pycnidien nur spärlich gebildet werden.

Der biotrophe Hyperparasit *Gliocephalis hyalina* Matruchot konnte bisher *in vitro* nur in Gegenwart eines Wirtspilzes, insbesondere *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten, kultiviert werden [GAMS *et al.*, 1999].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Kofermentation heterologer Mikroorganismen als Methode durchaus geeignet ist, die biologische Diversität chemischer Strukturen zu verbreitern und zu entwickeln.

Die erfolgreiche Ausnutzung dieser Methode im Sinne einer „kombinatorischen Biosynthese“ oder „kombinatorischen Fermentation“ erfordert allerdings ein erhebliches Maß an Voruntersuchungen (Produktspektrum beider Partner, vergleichbare Biosynthesewege, Analyse des Fermentationsverhaltens in Rein- und Kokultur).

#### 4.3. Strukturen von Lipoaminopeptid- und Peptaibol-Antibiotika und mögliche Bedeutung dieser Substanzklassen für die Ökologie der mykophilen Produzenten:

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden aus Reinkulturen des Mykoparasiten *Mycogone rosea* DSM 12973 bzw. Kokulturen dieses Stammes mit dem Endophyten *Acremomyium spec.* Tbp-5 insgesamt 28 neue Lipoaminopeptide nachgewiesen und strukturell charakterisiert.

Als Vertreter dieser relativ kleinen Klasse von Peptid-Antibiotika waren aus der Literatur bisher 5 Trichopolyne aus *Trichoderma polysporum* TMI 60146 [FUJI *et al.*, 1978; IIDA *et al.*, 1999], 2 Helioferine aus *Mycogone rosea* DSM 8822 [GRÄFE *et al.*, 1995] und 22 Leucinostatine aus verschiedenen Stämmen von *Paecilomyces marquandii* (Masse) Hughes bzw. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson [Übersicht in ISOGAI *et al.*, 1992] sowie das Leucinostatin- $\alpha$ -O-di-glucosid aus *Acremomyium spec.* Tbp-5 [STROBEL & HESS, 1997] bekannt.

Aus den Ergebnissen der kombinierten Fütterung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und ausgewählter nicht-proteinogener Aminosäuren ist ersichtlich, daß auch der an der Biosynthese des Roseoferin-Komplexes beteiligte Multienzym-Komplex eine limitierte Substratspezifität besitzt, wie die Substitution des L-Prolins in Position 2 durch Zufütterung von L-4-Hydroxyprolin belegt. Ein solcher Austausch des L-Prolins in Position 5 der Aureobasidine aus *Aureobasidium pullulans* durch L-4-Hydroxyprolin oder L-Thioprolin ist bereits in der Literatur beschrieben worden [TAKESAKO *et al.*, 1996]. Der Austausch von D-Hydroxyprolin durch Fütterung von L-Prolin bewirkt nach OKUMURA [1990] eine Erhöhung der antibiotischen Aktivität der Viridogriseine. Andererseits werden offenbar nur solche biosynthetischen Veränderungen in der Struktur der Roseoferine toleriert, die nicht zu einer Verkleinerung oder Vergrößerung der Anzahl der Bausteine in der Peptidkette führen, wobei die biologische Aktivität, d.h. die Paßfähigkeit für das natürliche Protein-Target, erhalten bleibt, wie für andere nicht-ribosomale Peptidbildner berichtet. So konnten Roseoferine mit einem Molekulargewicht von mehr als 1180 Da bzw. weniger als 1090 Da bisher nicht nachgewiesen werden. Auch die Qualität und Sequenz der Aminosäuren bleibt in bestimmten Molekülbereichen konservativ (siehe Abb. 9, 27 und 28) So käme ein hypothetischer Einbau dreier L-2,4-Diaminobutyrat-Reste ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ ,  $m/z$  100) anstelle der drei  $\alpha$ -Aminoisobutyrat-Reste ( $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$ ,  $m/z$  85) einer Kettenverlängerung um  $m/z$  45 gleich.

Wie in **Tab. 24** dargestellt, wurden Lipoaminopeptid-Antibiotika - mit Ausnahme der Verbindungen aus *Acremomyces spec.* Tbp-5 - bisher nur aus mykophilen Saprophyten und Parasiten erhalten:

**Tab. 24:** Wirtsspektrum der mykophilen Produzenten von Lipoaminopeptid-Antibiotika

Mykoparasit	Wirtspilze
<i>Paecilomyces lilacinus</i> A-267, No. 1907, P168	Sklerotien von <i>Aspergillus flavus</i> und <i>Asp. parasiticus</i> [GAMS <i>et al.</i> , 1999] sowie auf <i>Sclerotinia spec.</i> [WICKLOW & WILSON, 1990]
<i>Paecilomyces marquandii</i>	Agaricales, bevorzugt an <i>Hygrophorus</i> [HAWKSWORTH, 1981]
<i>Trichoderma polysporum</i> TMI 60146	<i>Lentinus edodes</i> [FUJI <i>et al.</i> , 1981]. Die Art wird als polyphager Mykoparasit eingestuft.
<i>Mycogone rosea</i> DSM 8822	<i>Macrolepiota spec.</i> [GRÄFE <i>et al.</i> , 1995]. <i>M. rosea</i> kommt auf mindestens 13 Gattungen der Pezizales und Agaricales vor [ARNOLD, 1976; HAWKSWORTH, 1981; HELFER, 1991].
<i>Mycogone rosea</i> DSM 12973	<i>Macrolepiota spec.</i> [SCHLEGEL, B.; persönliche Mitteilung 1998]

Neben den linearen, sind cyclische Lipopeptide, wie das n-palmitinsäurehaltige Cryptocandin A aus dem endophytischen Deuteromyceten *Cryptosporiopsis cf. quercina* [STROBEL *et al.*, 1999] und ca. 200 Vertreter der mit den Lipoaminopeptiden strukturverwandten linearen Peptaibol-Antibiotika pilzlichen Ursprungs bekannt. Der überwiegende Teil dieser Verbindungen wurde aus Mycelkulturen der Gattungen *Emericellopsis* und *Trichoderma* isoliert [WHITMORE *et al.*, 1997; WHITMORE *et al.*, 2000]. Auffällig ist in diesem Zusammenhang wiederum der schon bei den Lipoaminopeptiden diskutierte, bemerkenswert hohe Anteil mykophiler Parasiten bzw. Saprophyten als Produzenten von Peptaibolen.

Die meisten Peptaibole besitzen einen acetylierten N-Terminus; es sind jedoch auch N-terminal modifizierte Vertreter dieser Strukturklasse beschrieben worden, bei denen anstelle des Acetats ein Octansäure- [AUVIN-GUETTE *et al.*, 1992 und 1993; TSANTRIZOS *et al.*, 1996], Decansäure- [TSANTRIZOS *et al.*, 1996], Z-4-Decensäure [FUJITA *et al.*, 1994] oder ein 2-Methyl-3-oxo-tetradecansäure-Rest [HEINZE *et al.*, 1997] eingebaut ist.

Der C-Terminus der Peptaibole wird zumeist von einer zum Alkohol reduzierten Aminosäure gebildet. Beschrieben sind Valinol [LECLERC *et al.*, 1998], Leucinol [RITZAU *et al.*, 1997], Phenylalaninol [HÜLSMANN *et al.*, 1998] und Tryptophanol [DORNBERGER *et al.*, 1995]; weiterhin Aib-OCH<sub>3</sub> [AUVIN-GUETTE *et al.*, 1992], Glycin [SHARMAN *et al.*, 1986] oder  $\alpha$ -Alanin als freie Säure [HEINZE *et al.*, 1997], 2-[(2-Amino-3-phenylpropyl)amino]ethanol [KUMENZAWA *et al.*, 1993 und 1994]; jedoch auch ein esterartig verknüpfter O-Mannitol-Rest [CHIKANISHI *et al.*, 1996]. Bei den linearen Gramicidinen A, B und C nimmt Aminoethanol diese Position ein [KUBOTA, 1988].

Bemerkenswert ist zudem das Vorkommen ungewöhnlicher, nichtproteinogener Aminosäuren im Molekül: alle Lipoaminopeptide und Peptaibole enthalten die bisher nur in pilzlichen Sekundärmetaboliten aufgefundene  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Aib), deren Vorkommen im Molekül namensgebend für die Verbindungsklasse der Peptaibole ist; daneben kommen D- und L-Isovalin (Iva), *cis*-4-L-Hydroxyprolin (Hyp) und  $\alpha$ -Ethyl-L-norvalin (EtNor) vor; letzteres wurde bisher in der belebten Natur lediglich als Bestandteile der Peptaibole LP237-F5 und -F8 aufgefunden [TSANTRIZOS *et al.*, 1996].

Die Modifikationen im C- und N-Terminus der Peptaibole lassen Parallelen zur Struktur der im Rahmen dieser Art gefundenen 28 Lipoaminopeptide sowie zu den Trichopolynen, Leucinostatinen und Helioferinen erkennen.:

Diese sind N-terminal jeweils durch (2E)-4-Methylhex-2-ensäure (MeHA) bzw. entweder 2-Methyloctan-, 2-Methyldecan- oder 3-Hydroxy-2-methyldecansäure (HMDA) [IIDA *et al.*, 1999] substituiert; und auf diese Fettsäure folgt stets ein L-Prolyl- bzw. *cis*-4-L-Hydroxyprolyl-Rest. Danach ist – mit Ausnahme einiger Leucinostatine [ISOGAI *et al.*, 1992] ein 2-Amino-4-methyl-6-hydroxy-8-oxo-decansäure-Rest (AHMOD) vorhanden. Im Molekül sind jeweils drei bzw. vier  $\alpha$ -Aminobutyrate-Reste enthalten: bei den Leucino- und Acremostatinen, Helio- und Roseoferinen in Position 5; 8 und 9 und bei den Trichopolynen in Position 5; 6; 9 und z. T. 10.

Der C-Terminus ist jeweils durch ein Amin geschützt: bei den Leucino- und Acremostatinen handelt es sich entweder um (2S)-N<sup>1</sup>-Methyl-1,2-propan-diamin (MPD), (2S)-N<sup>1</sup>, N<sup>1</sup>-Dimethyl-1,2-propan-diamin (DPD) oder (2S)-N<sup>1</sup>, N<sup>1</sup>-Dimethyl-1,2-propan-diamin-N-oxid; bei den Trichopolynen hingegen um AMAE (Syn.: Trichodiaminol); und im Falle der Helio- und Roseoferine sind entweder AAE oder AMAE enthalten.

Alle Lipoaminopeptide besitzen ein qualitativ sehr ähnliches antimikrobielles Wirkungsspektrum. Eine Wachstumshemmung wird bei grampositiven Bakterien,

einschließlich Vertretern der Gattung *Mycobacterium*, Hefen und Pilze; jedoch nicht gegenüber gramnegativen Bakterien beobachtet.

Für die Leucinostatine A und B [MORI *et al.*, 1983; MIKAMI *et al.*, 1984; SHIMA *et al.*, 1990] und das Trichopolyn A [TERADA *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse, zitiert in MATSUZAKI *et al.*, 1991] werden zudem eine Hemmung der mitochondrialen ATPase und in höheren Konzentrationen eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in Rattenleber-Mitochondrien angegeben. Desweiteren sind für das Leucinostatin A ionophore Wirkungen im Bilayer-Lipid-Membran-Modell und an T-Lymphozyten, eine Protonen-Translokation in Chloroplasten bzw. in Chromatophoren von *Rhodospirillum rubrum* beschrieben, eine Dissipation des Protonen- und Kalium-Gradienten in Wurzelsegmenten von *Zea mays* und eine Freisetzung von Glucose aus Liposomen [Übersicht in CSERMELY *et al.*, 1994].

Die biologischen Aktivitäten von Lipoaminopeptiden können mit einer Erhöhung der Permeabilität bakterieller und mitochondrialer Membranen erklärt werden. Im Falle des Trichopolyns A konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung der Peptid-Konzentration bzw. ein Absinken der Lipid-Konzentration an einer artifiziellen Membran deren jeweils stärkere Zerstörung bedingt. Offensichtlich scheint dieser Mechanismus die Ursache für die antimikrobielle, zytotoxische und hämolytische Wirkung der Roseoferine, Helioferine [GRÄFE *et al.*, 1995; GRIGORIEV *et al.*, 1996] und Trichopolyne [MATSUZAKI *et al.*, 1991] darzustellen:

Trichopolyn A und Hypelcin penetrieren in die hydrophobe Region einer Bilayer-Lipid-Membran und erhöhen deren Permeabilität durch die Zerstörung ihrer Architektur. Hierbei scheint die freie Hydroxyl-Gruppe des C-terminalen Aminoalkohols eine essentielle Rolle zu spielen (siehe z. B. Ionenkanalbildung durch die linearen Gramicidine); ist sie – wie im Falle des Dodekapeptaibols NA VII – methyliert, fehlt die Membranaktivität.

Eine Bildung polarer Poren durch einzelne oder Aggregate von Trichopolyn-Molekülen und eine dadurch bedingte Bildung von spannungsabhängigen bzw. spannungsunabhängigen Ionenkanälen, wie sie für die Chrysospermine [GRIGORIEV *et al.*, 1995] beschrieben worden ist, kann somit ausgeschlossen werden.

Offenbar ist die Länge der Peptidkette für die Ausbildung stabiler Ionenkanäle entscheidend: Im Falle der synthetischen BKBA-Peptide wurde gezeigt, daß eine Verlängerung der Kette von 12 auf 16 und schließlich 20 Aminosäure-Reste die Leitfähigkeit, also Ionen-Permeabilität, einer Phospholipid-Membran erhöht. Für die Ausbildung eines

stabilen, die Bilayer-Lipid-Membran umspannenden Ionenkanals waren mindestens 20 Aminosäure-Reste notwendig [HIGASHIMOTO *et al.*, 1999].

Im Falle des Undeca-Lipoaminopeptids Trichopolyn A könnte hingegen ein „Phasentrennungs-Effekt“ zur Erhöhung der Membranpermeabilität beitragen. Durch FTIR-PATR und CD-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß dieses Lipoaminopeptid, ungeachtet des Vorliegens der Membran als Gel oder im flüssig-kristallinen Zustande, bei der Bindung an eine artifizielle Membran eine amphipathische  $3_{10}$ - bzw.  $\alpha$ -helicale Konformation einnimmt, d. h., die eine Seite der Helices ist hydrophil, die andere hydrophob. Der ungebundene Anteil besitzt hingegen keine spezifische Konformation. Die Ausbildung solcher Helices in Phospholipid-Membranen wird durch die im Molekül enthaltenen Aib-Reste bedingt und verleiht den Peptaibolen eine gewisse Stabilität [HIGASHIMOTO *et al.*, 1999]. Die zumeist monomeren Peptid-Helices des Trichopolyns A und Hypelcins A verteilen sich entweder zufällig in der Membran, oder sind in Winkeln um etwa  $54,7^\circ$  in ihr orientiert. Bedingt durch die antiparallele Bindung des Trichopolyns A in der Membran, könnte es entweder zu einer Interaktion mit den beiden Acyl-Ketten eines Lipid-Moleküls kommen, oder diese könnten ebenso mit den MDA/AHMOD-Seitenketten eines weiteren Trichopolyn-Moleküls am gegenüberliegenden Faltblatt der Bilayer-Membran interagieren, was zu einer Fixierung der Acyl-Ketten in einer Art all-trans-Konformation und somit zur Zerstörung der Membran im flüssigen Zustande führt.

Die hier diskutierten protonophoren bzw. ionenkanalbildenden Eigenschaften der Lipoaminopeptide und die für Peptaibole bekannten Fakten können zur Erklärung der biologischen Wirksamkeit und der Bedeutung dieser Verbindungen für die Interaktion der mykophilen Produzenten mit ihren Wirtspilzen beitragen:

Der nekrotrophe Mykoparasit *Trichoderma polysporum* Rifai TMI 60146 ist beispielsweise als extrem destruktives Pathogen in Shiitake-Kulturen bekannt. *In vitro* wurde eine starke inhibitorische Wirkung der produzierten Trichopolyne A und B auf *Lentinus edodes* und eine Reihe anderer wirtschaftlich bedeutender Speisepilze nachgewiesen [FUJI *et al.*, 1978].

Die vier einheimischen Vertreter der Gattung *Mycogone* sind ausschließlich als Mykoparasiten beschrieben. Während *M. calospora* ausschließlich auf *Ramaria*-Arten und *M. cervina* fast ausschließlich auf Fruchtkörpern der Helvellaceen vorkommt, besitzen die anderen beiden Species eine große ökonomische Bedeutung als Pathogene auch in kommerziell angebauten Pilzkulturen [ARNOLD, 1976; HELFER, 1991].

Ein Befall mit *Mycogone rosea* führt zu bräunlicher, oft zonierter Verfärbung des Hutes und schließlich zur Vergilbung des gesamten Fruchtkörpers. Bei Infektion mit *Mycogone*



*perniciosa* kommt es zur Verlängerung des Stiels, gefolgt von einer Deformation der Lamellen und letztendlich zur Zersetzung der Karpophoren unter Freisetzung eines braunen Exsudats [HAWKSWORTH, 1981; FLETCHER *et al.*, 1995].

Eine mögliche Erklärung der beschriebenen Befallsbilder wird im folgenden gegeben; die Bestätigung dieser Hypothesen durch *in-vivo*-Experimente an unter Laborbedingungen kultivierbaren Wirtspilzen steht derzeit noch aus, erbrächte jedoch eine Reihe neuer, auch ökonomisch relevanter Erkenntnisse. Insbesondere die direkte Applikation lipoaminopeptid- oder peptaibolhaltiger Prüflösungen auf bzw. in Fruchtkörper von Wirtspilzen erscheint als interessanter Ansatz im Hinblick auf ein tieferes Verständnis der chemischen Interaktionen von Wirt und Mykoparasit während des Infektionsprozesses.

So wurde im Rahmen von *in-vitro*-Untersuchungen an *Trichoderma* ssp. eine Sukzession definierter biochemischer Interaktionen während des Infektionsprozesses beobachtet:

Erstens: Es kommt zu atypischen Verzweigungen der Hyphen des Parasiten und chemotropem Wachstum entlang eines Gradienten, ausgelöst durch Aminosäuren und Kohlenhydrate, in Richtung des Wirtspilzes.

Zweitens: Es folgt die spezifische Erkennungsreaktion, möglicherweise durch Sekretion von Agglutininen. Hierbei konnte demonstriert werden, daß ein in den Hyphen des Wirtspilzes *Rhizoctonia solani* vorhandenes Lectin spezifisch an Kohlenhydrat-Reste der Zellwand von *Trichoderma* ssp. bindet; während das Lectin von *Sclerotinia rolfii* ausschließlich Konidien des spezifischen Parasiten *Trichoderma hamatum* agglutinierte, jedoch keine Konidien der anderen getesteten *Trichoderma*-Species.

Drittens: Der Parasit wächst entlang der Hyphen des Wirts bzw. windet sich um sie herum.

Viertens: partieller Abbau der Zellwand des Wirts infolge der Exkretion lytischer Enzyme, vor allem ~~20~~-1,3-Glucanase und Chitinase. Danach kommt es zu einem Rückzug der Hyphen des Parasiten. Durch Vitalfärbung mit Fluoresceindiacetat wurde bestätigt, daß der Wirtspilz bis zu diesem Zeitpunkt am Leben bleibt [BARAK & CHET, 1986].

Der erste Schritt des Infektionsprozesses stellt jedoch eine relativ unspezifische Interaktion dar und ist bisher nur für wenige Mykoparasiten nachgewiesen worden, während die folgenden drei für eine erfolgreiche Infektion von ausschlaggebender Bedeutung sind [CHET, 1990].

Mit den infolge der Läsion der Zellwand entstandenen Poren wären nunmehr morphologische Strukturen vorhanden, welche die Einlagerung protonophorer bzw. Ionenkanal-bildender Peptaibole bzw. Lipoaminopeptide in die Zytoplasmamembran ermöglichen.

Auch von JEFFRIES & YOUNG wurde schon 1994 auf die potentielle Bedeutung einer Antibiotikabildung als ein Mediator des Mykoparasitismus verwiesen:

Während 70 von 80 untersuchten mykoparasitischen Isolaten von *Trichoderma* in der Lage waren, sich um die Hyphen von *Heterobasidium annosum* und *Rhizoctonia solani* zu winden, wurde ein Bersten der Hyphenspitzen dieser Wirtspilze bereits vor einer physischen Kontaktaufnahme mit den Hyphen des Mykoparasiten beobachtet. Daher wurde vorgeschlagen, daß Peptaibole, wie das von verschiedenen *Trichoderma*-Species produzierte Alamethicin [BRÜCKNER & PRZYBYLSKI, 1984], die Aktivität extrazellulärer Enzyme vorbereiten bzw. komplementieren könnten.

Im weiteren Verlauf käme es zum Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten der Zelle und somit zum Absterben des Wirtspilzes, der dem Mykoparasiten nun als Nährstoffquelle für eine saprophytische Ernährung von abgetötetem organischen Material dienen könnte.

Eine solche, als Perthotrophie bezeichnete Lebensweise [DÖRFELT, 1989], ist von HELFER [1991] für *Hypomyces chrysospermus* beschrieben worden und stünde mit den für *M. rosea* und *M. perniciosa* beschriebenen Befallsbildern im Einklang. Sie ist durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

1. Befall eines lebenden Wirts,
2. Abtötung dieses Wirts und
3. Saprophytische Ernährung von abgetötetem organischem Material, auf dem der Mykoparasit noch weiterwachsen und schließlich sporulieren kann.

In diesem Zusammenhang wäre ein systematisches Screening nach Inhaltsstoffen von *Mycogone* von Interesse, da – mit Ausnahme einiger Stämme von *M. rosea* – noch keine Sekundärmetaboliten dieser Gattung beschrieben worden sind. Frischisolate der Parasiten von jeweils befallenen Fruchtkörpern und – nach Möglichkeit – eine gleichzeitige Isolierung und Kultivierung des Wirtspilzes sowie spätere Kofermentationen, insbesondere auf Agarnährböden in Petrischalen, könnten hierbei von Nutzen sein.

Kürzlich ist jedoch von LEE *et al.* [1999 (a) und (b)] über ein weiteres, bemerkenswertes Phänomen berichtet worden:

Neben den von DORNBERGER *et al.* [1995] beschriebenen Chrysosperminen A (I), B (II), C (III) und D (IV) wurden das Boletusin aus den methanolischen Extrakten frischer Fruchtkörper von *Boletus spec.* und die Tylopeptine A und B aus denen des Gallenröhrlings *Tylophilus neofelleus* isoliert. Dabei fällt auf, daß insbesondere das Boletusin (V) eine bemerkenswert hohe Strukturhomologie zu den Chrysosperminen aufweist, welche von dem Mykoparasiten *Apiocrea chrysosperma* (Syn.: *Hypomyces chrysospermus*, Anamorphe: *Sepedonium chrysospermum*) produziert werden, welcher vor allem Vertreter der Boletaceen befällt (R = Trpol):

(I): Ac-Phe-Aib-**Ser**-Aib-**Aib**-Aib-Leu-Gln-Gly-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-**Aib**-Aib-Aib-Gln-R

(II): Ac-Phe-Aib-**Ser**-Aib-**Aib**-Aib-Leu-Gln-Gly-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-**Iva**-Aib-Aib-Gln-R

(III): Ac-Phe-Aib-**Ser**-Aib-**Iva**-Aib-Leu-Gln-Gly-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-**Aib**-Aib-Aib-Gln-R

(IV): Ac-Phe-Aib-**Ser**-Aib-**Iva**-Aib-Leu-Gln-Gly-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-**Iva**-Aib-Aib-Gln-R

(V): Ac-Phe-Aib-**Ala**-Aib-**Aib**-Aib-Leu-Gln-Gly-Aib-Aib-Ala-Aib-Pro-**Aib**-Aib-Aib-Gln-R

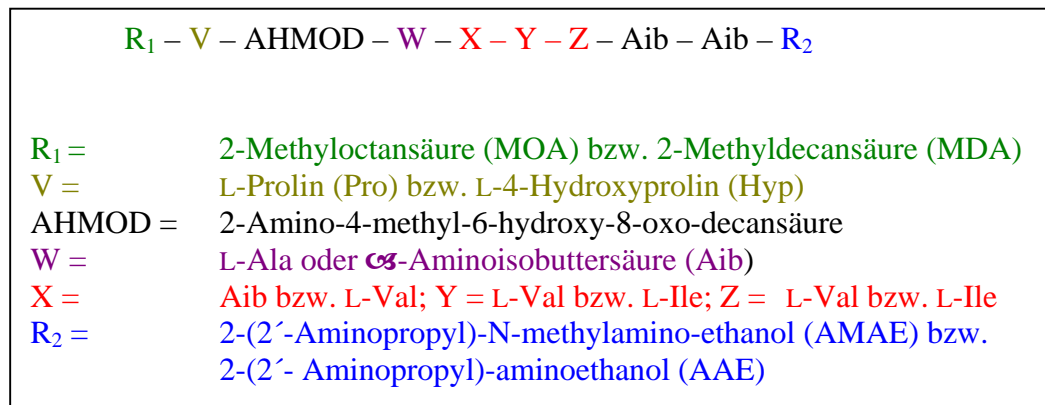
Eine hypothetische Erklärung für dieses Phänomen wäre einerseits ein nicht registrierter Befall der Fruchtkörper mit dem Mykoparasiten. Dies ist jedoch als relativ unwahrscheinlich zu werten, da die Gattung *Sepedonium* durch ihre leuchtend gelb bis orange gefärbten, massenhaft gebildeten Chlamydosporen auffällt. Daher müßte entweder eine Koevolution der Peptaibol-Biosynthese als effektive Strategie zum Schutz des Fruchtkörpers vor einer Besiedlung durch Mykoparasiten oder ein horizontaler Transfer von Genen der Peptaibol-Biosynthese diskutiert werden. Ein horizontaler Gentransfer bei Mykoparasiten wurde jedoch bisher nur im Falle von *Parasitella parasitica* und deren Wirtspilz *Absidia glauca* nachgewiesen:

Während des parasitischen Entwicklungscyclus verschmilzt ein Abschnitt der Infektionshyphe mit einer Wirtshyphe; und das auf diese Weise eingefügte genetische Material des Parasiten ist in der Lage, auxotrophe Mutanten des Wirts zu komplementieren. Die erworbene Prototrophie ist jedoch mitotisch instabil und geht zum Teil verloren [WÖSTEMEYER *et al.*, 1995].

## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse:

1. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Kofermentationen heterologer Mikroorganismen realisiert und hinsichtlich der Bildung neuer Sekundärmetabolite untersucht. Als Vergleich dienten die jeweiligen Leitmetaboliten der entsprechenden Reinkulturen beider Partner. Dabei wurden insgesamt 34 Substanzen bearbeitet, von denen 28 als neue chemische Strukturen charakterisiert werden konnten.
2. Als ein erstes Modellsystem wurde die Interaktion zwischen dem Mykoparasiten *Mycogone cervina* CBS 465.67 und ihrem unter natürlichen Bedingungen befallenen Wirtspilz *Verpa digitaliformis* m1046 gewählt. Aus Reinkulturen von *Verpa digitaliformis* m1046 wurden das bereits bekannte instabile Polyenpigment Verpacrocine sowie drei weitere, stark autoxidationsanfällige Polyene isoliert. Reinkulturen des Mykoparasiten *Mycogone cervina* CBS 465.67 zeigten hingegen keine Bildung von charakteristischen Leitmetaboliten. Dementsprechend wurde auch in Kofermentationen beider Stämme lediglich das bereits durch Reinkulturen des Wirtspilzes gebildete Polyen-Gemisch nachgewiesen. Es waren weder neue Metabolite, noch Biotransformationsprodukte der Polyene festzustellen, so daß diese Mikrobekombination nicht weiterbearbeitet wurde.
3. Als weiteres Wirt-Mykoparasit-Paar wurde die Kombination aus *Macrolepiota procera* und *Mycogone rosea* gewählt. Dazu wurden zunächst die Reinkulturen untersucht. Aus *Mycogone rosea* DSM 12973 konnte dabei ein Komplex aus mindestens 18 Lipoaminopeptiden isoliert werden, die mit den üblichen chromatographischen Methoden nicht auftrennbar waren. Davon sind 16 Metabolite, die als Roseoferine A bis G bezeichnet wurden, neue Verbindungen. Zur Isolierung und Strukturaufklärung der im Rahmen dieser Arbeit aufgefundenen Lipoaminopeptide wurde neben chromatographischen Methoden insbesondere die massenspektrometrische Hochleistungs-Analytik (HRESI-MS, ESI-CID-MS/MS, ESI-CID-MS<sup>n</sup> und die LC-gekoppelte ESI-MS<sup>n</sup>) eingesetzt. ESI-CID-MS<sup>n</sup>-Untersuchungen mit einem Ion-Trap-Analysatorgerät erwiesen sich dabei als leistungsfähige Methode zur Charakterisierung chromatographisch nicht voneinander trennbarer Positions-isomere mit gleichem Molekulargewicht.

4. Die Strukturen der einzelnen Antibiotika des Roseoferin-Helioferin-Komplexes werden durch folgende allgemeine Formel wiedergegeben:

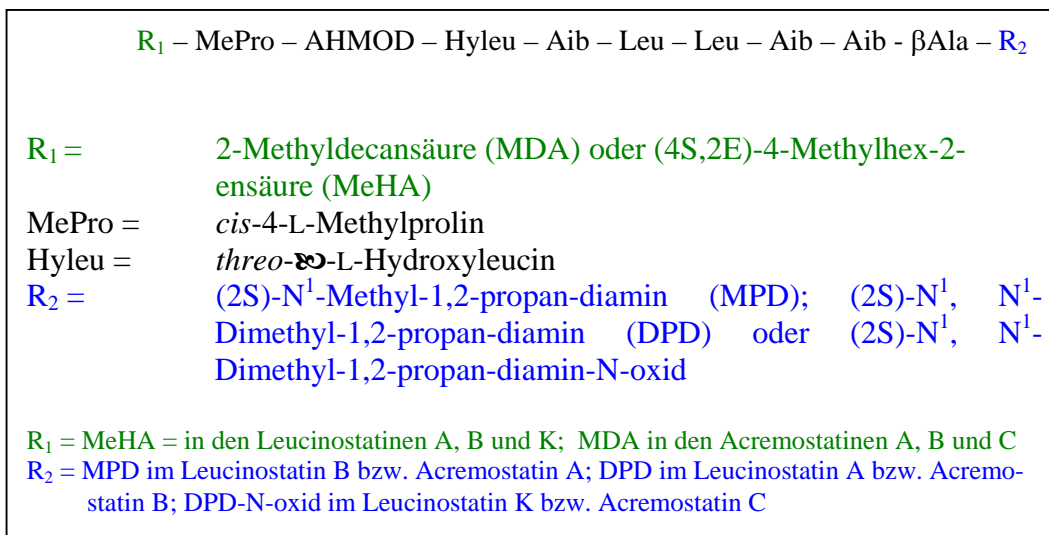


**Abb. 27 :** Allgemeine Struktur der Antibiotika des Roseoferin-Helioferin-Komplexes aus *Mycogone rosea* DSM 12973

5. Für den Komplex der Roseoferine wurden verschiedene biologische Wirksamkeiten festgestellt. So wurde *in vitro* eine antibiotische Aktivität gegen grampositive Bakterien und Mykobakterien nachgewiesen. Gehemmt wurde ferner das Wachstum einer Reihe filamentöser Pilze und Hefen, einschließlich *Candida albicans*. Nachgewiesen wurden zytotoxische und antiproliferative Effekte sowie die Bildung lipophiler Ionenpaare mit wasserlöslichen Anionen.
6. Der überwiegende Teil der bekannten Lipoaminopeptide und Peptaibole wird von mykophilen Pilzen produziert. Daher wird eine Bedeutung dieser Verbindungen für die Interaktion der Produzenten mit ihren Wirtspilzen auf Grund ihrer membranpermeabilisierenden Eigenschaften vorgeschlagen. Die Untersuchung weiterer Mykoparasiten sollte deshalb gute Chancen für das Auffinden weiterer Peptidwirkstoffe bieten.
7. Im Rahmen von Fütterungsexperimenten unter Verwendung chemisch definierter Medien wurde gezeigt, daß die reduzierenden Dissaccharide Maltose und Cellobiose einen fördernden Einfluß auf die Produktbildung des Roseoferin-Bildners ausüben, während bei Verwendung anderer Kohlenhydrate, von Fettsäuren und organischen Säuren als einziger Kohlenstoff-Quelle ein Rückgang bzw. eine vollständige Repression der Produktbildung beobachtet wurde. Gleiche Resultate wurden bei Anwesenheit von Aminen als einziger Stickstoff-Quelle erreicht.

8. Der Zusatz einer Reihe von Aminosäuren als einzige Stickstoff-Quelle förderte die Produktbildung des Stammes, ohne daß es zu einer qualitativen Veränderung des Roseoferin-Komplexes, z. B. infolge des Einbaus der zugefütterten Aminosäure, kam.
9. Bei Supplementierung zweier definierter Stickstoff-Quellen, wie z. B.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und L-4-Hydroxyprolin, entstanden in Reinkulturen von *M. rosea* DSM 12973 wenigstens neun weitere, strukturell neue Lipoaminopeptide - die Roseoferine H, I und K. Die massenspektrometrischen Untersuchungen bewiesen den Einbau des zugesetzten L-4-Hydroxyprolins anstelle des L-Prolins in Position 2 der Peptidkette. Dieses Ergebnis belegt die relative Unspezifität von Enzymen der nicht-ribosomalen Biosynthese dieses Stammes. Er sollte deshalb in Kofermentation mit geeigneten Partnern als Donoren von nutzbaren Präkursorüberschüssen in der Lage sein, neue Sekundärmetabolite zu bilden.
10. Im Gegensatz zu dieser Erwartung, wurden in Kokultur von *M. rosea* DSM 12973 mit dem unter natürlichen Bedingungen befallenen Wirtspilz *Macrolepiota procera* F 050 keine Veränderungen des Roseoferin-Spektrums beobachtet.
11. Da in den beiden untersuchten Kombinationen aus Wirtspilz und Mykoparasit keine neuen Metabolitbiosynthesen beobachtet werden konnten, wurde die Möglichkeit einer Kofermentation von *Mycogone rosea* DSM 12973 mit „Nicht-Wirtspilzen“ überprüft. Auf der Suche nach geeigneten Kofermentationspartnern wurde der endophytische Pilz *Acremomium spec. Tbp-5* ausgewählt, der ein Gemisch der bekannten Leucinostatine A, B und K produziert. In der Literatur wurde für ihn eine spezifische Glykosidierung der beiden freien Hydroxyl-Gruppen des Leucinostatins A beschrieben, das den Roseoferinen aus *Mycogone rosea* strukturell sehr ähnlich ist. Die Zielstellung war, eine kofermentative Glykosidierung der beiden freien OH-Gruppen der Roseoferine durch Tbp-5 zu erreichen. Es konnte jedoch weder eine Bildung von Leucinostatin A-~~2~~-O-di-glucosid, noch eine Glykosidierung der Roseoferine nachgewiesen werden.
12. In Kokultur von *M. rosea* DSM 12973 und *Acremomium spec. Tbp-5* wurde dagegen die Bildung von drei neuen Lipoaminopeptiden nachgewiesen, die als Acremostatine A, B und C bezeichnet werden. Die Bildung der Acremostatine wurde ebenso bei Zusatz von Helioferin als Antibiotikum des Roseoferinkomplexes zu Reinkulturen des Stammes Tbp-5 festgestellt. ESI-CID-MS<sup>n</sup>-Untersuchungen an den Acremostatinen A, B und C zeigten die strukturelle

Homologie mit den Leucinostatinen A, B und K. Die Präzisionsmassenbestimmung zeigte den Austausch der am N-Terminus aller in der Literatur beschriebenen Leucinostatine vorhandenen (4S,2E)-4-Methylhex-2-ensäure (MeHA) durch die in den Roseoferinen A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> und G vorkommende 2-Methyldecansäure (MDA):



**Abb. 28:** Allgemeine Struktur der Acremostatine A, B und C und der Leucinostatine A, B und K aus *Acremomium spec.* Tbp-5

13. Die Strukturbeweisführung für die Acremostatine wurde ferner durch das Auftreten charakteristischer Peptid-Spaltfragmente in älteren, auf helioferinhaltigem Agar kultivierten Reinkulturen von Tbp-5 belegt. Gleiche Fragmente wurden *in vitro* bei Inkubation der Modellsubstanz Helioferin mit Pronase erreicht.
14. Die mit bestimmten Partnern gesammelten speziellen Ergebnisse dieser Arbeit zur Biosynthese neuer Metabolite lassen allgemeine Aussagen zur Realisierbarkeit von Kofermentation zu. Um die Bildung neuer Sekundärmetabolite unter diesen Bedingungen beobachten zu können, sind folgende Voraussetzungen erforderlich:
  - Gutes Wachstum beider Partner in Kokultur, d. h. keine Produktion toxischer Metabolite;
  - Überschußproduktion von Vorläufern (Präkursoren der Biosyntheseprodukte des jeweiligen Partners durch den anderen Partner);

- Kompatibilität der Biosynthesewege, d. h. Akzeptanz der durch den Partner gebildeten Vorläufer als Substrate der Sekundärmetabolit-Biosynthese und
- eine zeitliche Übereinstimmung der Sekundärmetabolitproduktion beider Partner und Fähigkeit zur Sekretion der Sekundärmetabolite in das Medium.



## 6. Literaturverzeichnis:

Anonymus: Dictionary of Natural Products on CD-ROM. Chapman and Hall London [1997]

Anonymus: Europäisches Arzneibuch. Amtliche deutsche Ausgabe. 3. Ausgabe. (EAB 3) S. 113 – 118 [1997]

Anonymus: Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie. E. Merck Darmstadt [1970]

Anonymus: National Committee for Clinical Laboratory Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M-7. NCCLS, Villanova, Pa. [1991]

Anonymus: National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts. M27-P. NCCLS, Villanova, Pa. [1991]

Arai, T.; Mikami, Y.; Fukushima, K.; Utsumi, T.; Yazawa, K.: A new antibiotic, leucinostatin, derived from *Penicillium lilacinum*. J. Antibiot., **26**, 157 – 163 [1973]

Arnold, G. R. W.: Bestimmungsschlüssel für die wichtigsten und häufigsten mykophilen Ascomyceten und Hyphomyceten. Zeitschr. f. Pilzkunde, **35**, 41 – 45 [1969]

Arnold, G. R. W.: Internationale Bibliographie der Hypomycetaceae (Mycophyta, Ascomycotina). Bibliographische Mitteilungen der Universitätsbibliothek Jena, **25**, Jena [1976]

Auvin-Guette, C.; Rebuffat, S.; Prigent, Y.; Bodo, B.: Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. J. Am. Chem. Soc., **114**, 2170 – 2174 [1992]

Auvin-Guette, C.; Rebuffat, S.; Vuidepot, I.; Massias, M.; Bodo, B.: Structural elucidation of trikonigins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*.

J. Chem Soc. Perkin Trans I, 249 – 255 [1993]

Awazu, N.; Ikai, K.; Yumamoto, J.; Nishimura, K.; Mizutani, S.; Takesako, K.; Kato, I.: Structures and antifungal activity of new aureobasidins. J. Antibiot., **48**, 525 – 527 [1995]

Barak, R.; Chet, I.: Determination, by fluorescence in diacetate staining, of fungal viability during mycoparasitism. Soil Biol. Biochem., **18**, 315 – 319 [1986]

Bayer, E.; Gförer, P.; Restel, C.: Coordination-Ion-Spray-MS (CIS-MS), a universal detection and characterization method for direct coupling with separation techniques. Angew. Chem. Int. Ed., **38**, 992 – 996 [1999]

Barnett, H. L.; Hunter, B. B.: Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>th</sup> ed. Macmillan Publishing Company New York, Collier Macmillan Publishers London [1987]

Bèrды, J.: The discovery of new bioactive microbial metabolites: Screening and identification. Progr. Ind. Microbiol., **27**, 3 – 25 [1989]

Berg, A.; Ritzau, M.; Ihn, W.; Fleck, W. F.; Heinze, S.; Gräfe, U.: Isolation and structure of bergofungin, a new antifungal peptaibol from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059. J. Antibiot., **49**, 817 – 820 [1996]

Berg, A.; Schlegel, B.; Ihn, W.; Demuth, U.; Gräfe, U.: Isolation and structure of new peptaibols, bergofungins B, C and D, from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059. J. Antibiot., **52**, 666 – 669 [1999]

Besl, H.; Bresinsky, A.; Meixner B.; Moeck, U.; Steglich, W.: Verpacrocin, ein Polyenpigment aus Mycelkulturen von *Verpa digitaliformis* (Pers.) Fr. Ascomycetes. Z. Naturforsch., **38c**, 492 – 493 [1983]

Bills, G. F.: Analysis of microfungal diversity from a user's perspective. Can. J. Bot., **73** (Suppl. 1), S 33 – S 41 [1995]

Bresinsky, A.: Zur Frage der taxonomischen Relevanz chemischer Merkmale bei hoeheren Pilzen. Bull. Soc. Linn. Lyon, **43**(n° spécial), 61 – 68 [1974]

Brückner, H.; Keller-Hoehl, C.: HPLC separation of DL-amino acids derivatized with  $N^2$ -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl-L-amino acid amides. Chromatographia, **30**, 621 – 629 [1990]

Brückner, H.; Przybylski, M.: Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by HPLC with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. J. Chromat., **296**, 263 – 275 [1984]

Bush; L. P.; Wilkinson, H. H.; Schradl, C. L.: Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbiosis. Plant Physiol., **114**, 1 –7 [1997]

Campbell, R.: Mikrobielle Ökologie. Wissenschaftliche Taschenbücher Biologie. Band 272. Akademie-Verlag Berlin [1981]

Caporale, L. H.: Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **92**, 75 – 82 [1995]

Chet, I.: Mycoparasitism – recognition, physiology, and ecology. New directories in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. UCLA symposia on molecular and cellular biology. New Series, **112**, 725 – 734 New York, N. Y. [1990]

Chikanishi, T.; Hasumi, K.; Harada, T.; Kawasaki, N.; Endo, A.: Clonostachin, a novel peptaibol that inhibits platelet aggregation. J. Antibiot., **50**, 105 –110 [1996]

Christner, C.; Zerlin, M.; Gräfe, U.; Heinze, S.; Küllertz, G.; Fischer, G.: Lipohexin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase from *Moeszia lindtneri* (HKI-0054) and *Paecilomyces* sp. (HKI-0055; HKI-0096). II. Inhibition activity and specifity. J. Antibiot., **50**, 384 – 389 [1997]

Csermely, P.; Radics, L.; Rossi, C.; Szamel, M.; Ricci, M.; Mihály, K.; Somogyi, J.: The nonapeptide leucinostatin A acts as a weak ionophore and as an immunosuppressant on T lymphocytes. Biochim. Biophys. Acta, **1221**, 125 – 132 [1994]

von Döhren, H.; Gräfe, U.: General aspects of secondary metabolism. pp. 1 – 55.

*In:* Rehm, H.-J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P.: Biotechnology. Second completely revised edition. vol. 7: Products of secondary metabolism (eds.: Kleinkauf, H.; von Döhren, H.) VCH Weinheim [1997]

Dörfelt, H. (Hrsg.): Lexikon der Mykologie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1989

Dornberger, K.; Ihn, W.; Ritzau, M.; Gräfe, U.; Schlegel, B.; Fleck, W. F.:

Chrysospermins, new peptaibol antibiotics from *Apiocrea chrysosperma* Ap 101.

J. Antibiot., **48**, 977 – 989 [1995]

Dutton, C. J.; Gibson, S. P.; Goodie, A. C.; Holdom, K. S.; Pacey, M. S.; Ruddock, J.;

Bu'lock, J. D.; Richards, M. K.: Novel avermectins produced by mutational biosynthesis.

J. Antibiot., **44**, 357 – 365 [1991]

Ederada, R. A.; Wray, V.; Berg, A.; Gräfe, U.; Sudarsono; Brauers, G.; Proksch, P.:

Novel spiciferone derivatives from the fungus *Drechslera hawaiiensis* isolated from the marine sponge *Callyspongia aerizusa*. Z. Naturforsch., **55c**, 218 – 221 [2000]

Fiedler, H-P.; Fiedler, E.: Secondary metabolites isolated by Hans Zähler and his group (1954 - 1994). Zeeb-Druck Tübingen [1995]

Fletcher, J. T.; Jaffe, B.; Muthumeenakshi, S.; Brown, A. E.; Wright, D. M.:

Variations in isolates of *Mycogone perniciosa* and in disease symptoms in *Agaricus bisporus*.

Plant Pathology, **44**, 130 – 140 [1995]

Fritsche, W.: Umwelt-Mikrobiologie: Mikrobiologie des Umweltschutzes und der Umwelt-Gestaltung. Wissenschaftliche Taschenbücher Biologie. Band 272. Akademie-Verlag Berlin [1985]

Frobel, K.: Vortrag auf dem DECHEMA-Symposium „Aktuelle Entwicklungen in der Naturstoffforschung“ – Tagungshandbuch zu den 12. Irseer Naturstofftagen der DECHEMA e.V. im Schwäbischen Tagungs- und Bildungszentrum Irsee vom 23. bis 25. Februar 2000

Fuji, K.; Fujita, E.; Takaishi, Y.; Fujita, T.; Arita, I.; Komatsu, M.; Hiratsuka, N.:  
New antibiotics, trichopolyns A and B: Isolation and biological activity.  
*Experimentia*, **34**, 237 – 239 [1978]

Fujita, T.; Takaishi, Y.; Okamura, A.; Fujita, E.; Fuji, K.; Komatsu, M.; Arita, I.:  
New peptide antibiotics, trichopolyns I and II, from *Trichoderma polysporum*.  
*J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 585 – 587 [1981]

Fujita, T.; Wada, S.-I.; Iida, A.; Nishimura, T.; Kanai, M.; Toyoma, N.:  
Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols,  
trichodecenins-I and -II, from *Trichoderma viride*. *Chem. Pharm Bull.*, **42**, 489 – 494 [1994]

Fukushima, K.; Arai, T.; Mori, Y.; Tsuboi, M.; Suzuki, M.: Studies on peptide antibiotics,  
leucinostatins. II. The structures of leucinostatins A and B.  
*J. Antibiot.*, **36**, 1613 – 1630 [1983]

Gams, W.; Diederich, P.; Pöldmaa, K.: Fungicolous fungi. *In*: Miller, G.; Bills, G.;  
Rossmann, A. Y. (eds.): Fungal biodiversity. Smithsonian Washington D.C. [1999]

Gandy, D. G.: Inhibition of *Mycogone perniciosa* growth by *Acremonium strictum*.  
*Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **72**, 151 – 155 [1979]

Grabley, S.; Thiericke, R. (eds.): Drug discovery from nature. Springer Verlag Berlin  
Heidelberg New York [1998]

Gloer, J. B.: Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products.  
pp. 249 – 268. *In*: Wicklow, D. T.; Sönderström, E. (eds.): The Mycota IV –  
Environmental and microbial relationships. Springer-Verlag Berlin Heidelberg [1997]

Gräfe, U.: Biochemie der Antibiotika: Struktur – Biosynthese – Wirkungsmechanismus.  
Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin New York [1992]

Gräfe, U.; Ihn, W.; Ritzau, M.; Schade, W.; Stengel, C.; Schlegel, B.; Fleck, W. F.; Künkel, W.; Härtl, A.; Gutsche W.: Helioferins: novel antifungal lipopeptides from *Mycogone rosea*: screening isolation and biological properties. J. Antibiot., **48**, 126 – 133 [1995]

Gräfe, U.; Heinze, S.; Schlegel, B.; Härtl, A.: Disclosure of new and recurrent microbial metabolites by mass spectrometric methods. J. Indust. Microbiol. Biotechnol., im Druck [2000]

Gräfe, U.; Heinze, S.; Ihn, W.: Massenspektrometrie. pp. 56 – 74. In: Adam, K. P.; Becker, H.: Analytik biogener Arzneistoffe. Pharmazeutische Biologie Band 4. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart [2000]

Gray, D. J.; Morgan-Jones, G.: Host-parasite relationships of *Agaricus brunnescens* and a number of mycoparasitic hyphomycetes. Mycopathologia, **75**, 55 – 59 [1981]

Grigoriev, P. A.; Schlegel, R.; Dornberger, K.; Gräfe, U.: Formation of membrane channels by chrysospermins, new peptaibol antibiotics. Biochim. Biophys. Acta, **1237**, 1 –5 [1995]

Grigoriev, P. A.; Berg, A.; Schlegel, R.; Gräfe, U.: Protonophoric activities of helioferin and pamamycin, lipophilic tertiary amine antibiotics from *Mycogone rosea* and *Streptomyces aurantiacus*. Bioelectrochem. Bioenerg., **39**, 295 – 298 [1996]

Grigoriev, P. A.; Berg, A.; Schlegel, R.; Gräfe, U.: Differences in ion permeability of an artificial membrane caused by ampullosporin and bergofungin, new 15-membered peptaibol-type antibiotics. Bioelectrochem. Bioenerg., **44**, 155 – 158 [1997]

Hawksworth, D. L.: A survey of the fungicolous conidial fungi. pp. 171 – 244. In: Cole G. T.; Kendrick, B. (eds.): Biology of conidial fungi. vol. 1. Academic Press New York London [1981]

Heinze, S.; Ritzau, M.; Ihn, W.; Schlegel, B.; Dornberger, K.; Fleck, W. F.; Zerlin, M.; Christner, C.; Gräfe, U.; Küllertz, G.; Fischer, G.: Lipohexin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase from *Moeszia lindtneri* (HKI-0054) and *Paecilomyces* sp. (HKI-0055; HKI-0096). I. Screening, isolation and structure elucidation. J. Antibiot., **50**, 379 – 383 [1997]

Heinze, S.; Hülsmann, H.; Schlegel, R.; Gräfe, U.: Advances of screening for natural compounds using mass spectrometric tools. pp. 167 – 176. *In*: Schreier, P.; Herderich, M.; Humpf, H.-U.; Schwab, W. (eds.): Natural Product Analysis: Chromatography – Spectroscopy – Biological Testing. Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH Braunschweig/Wiesbaden [1998]

Heinze, S.; Kronen, M.; Schlegel, B.; Härtl, A., Gräfe, U.: Disclosure and structure assignment of new peptaibol-type antibiotics with neuroleptic activity in mice. Poster auf dem Cambridge Healthtech Institute's Second Annual Advances in Mass Spectrometry for Pharmaceutical Research; Orlando (Florida) 09./10.12. 1999

Helfer, W.: Pilze auf Pilzfruchtkörpern. Untersuchungen zur Ökologie, Systematik und Chemie. IHW-Verlag Libri Botanici Vol. 1, Eching [1991]

Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 5, überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York [1995]

Higashimoto, Y.; Kodama, H.; Jelokhani-Niaraki, J.; Kato, F.; Kondo, M.: Structure-function relationship of model Aib-containing peptides as ion transfer intermembrane templates. *J. Biochem.*, **125**, 705 – 712 [1999]

Hölzl, A.; Schlotterbeck, G.; Albert, K.; Bayer, E.: Separation and characterization of hop bitter acids by HPLC-<sup>1</sup>H-NMR coupling. *Chromatographia*, **42**, 499 – 505 [1996]

Huang, Q.; Tezuka, Y.; Hatanaka, Y.; Kikushi, T.; Nishi, A.; Tubaki, K.: Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. III. New sesquiterpene alcohol from *Trichoderma koningii*. *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1035 – 1038 [1995]

Huang, Q.; Tezuka, Y.; Hatanaka, Y.; Kikushi, T.; Nishi, A.; Tubaki, K.: Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. IV. Minor peptaibols of *Trichoderma koningii*. *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1663 – 1667 [1995]

Hülsmann, H.; Heinze, S.; Ritzau, M.; Schlegel, B.; Gräfe, U.: Isolation and structure of peptaibolin, a new peptaibol from *Sepedonium* strains. *J. Antibiot.*, **51**, 1055 – 1058 [1998]

Iida, A.; Mihara, T.; Fujita, T.; Takaishi, Y.: Peptidic immunosuppressants from the fungus *Trichoderma polysporum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 3393 – 3396 [1999]

Isogai, A.; Suzuki, A.; Kuyama, S.; Tamura, S.: Constituents of a peptidal antibiotic P168 produced by *Paecilomyces lilacinus* (THOM) SAMSON. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 3029 – 3031 [1980]

Isogai, A.; Nakayama, Y.; Takayama, S.; Kusai, A.; Suzuki, A.: Structural elucidation of minor components of peptidyl antibiotic P168s (leucinostatins) by tandem mass spectrometry. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1079 – 1085 [1992]

Jeffries, P.: Biology and ecology of mycoparasitism. *Can. J. Bot.*, **73** (Suppl.1), S1284 – S1290 [1995]

Jeffries, P.; Young, T. W. K.: Interfungal parasitic relationships. International Mycological Institute, Egham [1994]

Johnson, G. T.; McHan, F.: Some effects of zinc on the utilization of carbon sources by *Monascus purpureus*. *Mycologia*, **71**, 806 – 816 [1975]

Kleinkauf, H.; von Döhren, H.: Applications of peptides synthetases in the synthesis of peptide analogues. *Acta Biochim. Pol.*, **44**, 839 – 848 [1997]

Kleinkauf, H.; von Döhren, H.: Cyclosporin – the biosynthetic path to a lipopeptide. pp. 533 – 555. *In*: Barton, D.; Nakanishi, K. (eds.-in-Chief); Meth-Cohn, O. (executive ed.): Comprehensive natural products chemistry. vol. 1: Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives (volume ed.: Sankawa, U.) Elsevier Amsterdam Lausanne New York Oxford Shannon Singapore Tokyo [1999]

Kleinwächter, P.; Luhmann, U.; Schlegel, B.; Heinze, S.; Härtl, A.; Kiet, T. T.; Gräfe, U.: New fasciculol-type triterpene compounds from *Hypholoma fasciculare*. *J. Basic Microbiol.*, **39**, 345 – 349 [1999]



Kobel, H.; Traber, R.: Directed biosynthesis of cyclosporins.

Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **14**, 237 – 240 [1982]

Kobel, H.; Loosli, H. R.; Voges, R.: Contribution to the knowledge of the biosynthesis of cyclosporin A. Experimentia, **39**, 873 – 876 [1983]

Kubota, K.: Biosynthesis of linear gramicidin, pentadecapeptide, is tight linked to serine metabolism and to membranous phosphoglyceride. pp. 331 – 337. In: Kleinkauf, H.; von Döhren, H.; Jaenicke, L. (eds.): The roots of modern biochemistry – Fritz Lipmann's squiggle and its consequences. Walter de Gruyter Berlin New York [1988]

Kumenzawa, S.; Kanda, M.; Aoyama, H.; Utagawa, M.; Kondo, J.; Yoshikawa, N.; Mikawa, T.; Chiga, I.; Hayase, T.; Hino, T.; Takao, T.; Shimonishi, Y.: Structure of aibellin, a new peptide that modifies rumen fermentation. Peptide Chem., 137 – 140 [1993]

Kumenzawa, S.; Kanda, M.; Aoyama, H.; Utagawa, M.; Kondo, J.; Sakamoto, S.; Ohtani, H.; Mikawa, T.; Chiga, I.; Hayase, T.; Hino, T.; Takao, T.; Shimonishi, Y.: Structural elucidation of aibellin, a new peptide antibiotic with efficiency on rumen fermentation. J. Antibiot., **47**, 1136 – 1144 [1994]

Laatsch, H.: Die Technik der organischen Trennungsanalyse – Eine Einführung.

Georg Thieme Verlag Stuttgart [1988]

Laatsch, H.: Antibase 2.0 – A database for rapid structure identification of microbial metabolites. Chemical Concepts Weinheim [1997]

Lancini, G.; Lorenzetti, R.: Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. Plenum Press New York London [1993]

Leclerc, G.; Rebuffat, S.; Goulard, S.; Bodo, B.: Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. I. Fermentation and isolation.

J. Antibiot., **51**, 170 – 177 [1998]

Leclerc, G.; Rebuffat, S.; Bodo, B.: Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. II. Structure elucidation. J. Antibiot., **51**, 178 – 183 [1998]

Lee, S.-J.; Yeo W.-H.; Yun, B.-S.; Yoo, I.-D.: Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus* ssp. J. Peptide Sci., **5**, 374 – 378 [1999]

Lee, S.-J.; Yun, B.-S.; Cho, D.-H.; Yoo, I.-D.: Tylopeptins A and B, new antibiotic peptides from *Tylophilus neofelleus*. J. Antibiot., **52**, 998 – 1006 [1999]

Lehmann, W. D.: Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford [1996]

Liberra, K.; Lindequist, U.: Marine fungi – a prolific resource of biologically active natural products ? Pharmazie, **50**, 582 – 588 [1995]

Lindon, J. C.; Farrant, R. D.; Sanderson, P.N.; Doyle, P. M.; Gough, S. L.; Spraul, M.; Hofmann, M.; Nicholson, J. K.: Separation and characterization of compounds of peptide libraries using on-flow coupled HPLC-NMR spectroscopy. Magn. Reson. Chem., **33**, 857 – 863 [1995]

Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Wilson, I. D.: Direct coupling of chromatographic separations to NMR spectroscopy. Prog. NMR Spectroscop., **29**, 1 – 49 [1996]

Lottspeich, F.; Zorbas, H. (Hrsg.): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin [1998]

Matsuzaki, K.; Shioyama, T.; Okamura, E.; Umemura, J.; Takenaka, T.; Takaishi, T.; Fujita, T.; Miyajima, K.: A comparative study on interactions of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid containing antibiotic peptides, trichopolyn I and hypelcin, with phosphatidylcholine bilayers. Biochim. Biophys. Acta, **1070**, 419 – 428 [1991]

McHan, F.; Johnson, G. T.: Some effects of zinc on the utilization of nitrogen sources by *Monascus purpureus*. Mycologia, **71**, 160 – 169 [1979]

Mikami, Y.; Fukushima, K.; Arai, T.; Abe, F.; Shibuta, H.; Ommura, Y.: Leucinostatins, peptide mycotoxins produced by *Paecilomyces lilacinus* and their possible roles in fungal infection. Zbl. Bakt. Hyg. A, **257**, 275 – 283 [1984]

Moeschler, H. F.: Vortrag auf dem DECHEMA-Symposium „Aktuelle Entwicklungen in der Naturstoffforschung“ – Tagungshandbuch zu den 6. Irseer Naturstofftagen der DECHEMA e.V. im Schwäbischen Tagungs- und Bildungszentrum Irsee vom 24. bis 28. Februar 1994

Mori, Y.; Suzuki, M.; Fukushima, K.; Arai, T.: Structure of leucinostatin B, an uncoupler on mitochondria. J. Antibiot., **36**, 1084 – 1086 [1983]

Moser, M.: Die künstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen. Forstwissenschaftl. Centralblatt, **77**, 32 – 40 [1958]

Niessen, W. M. A.; van der Greef, I.: Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. Marcel Dekker New York [1992]

Oberwinkler, F.; Bauer, R.; Bandoni, R. J.: Heterogastridiales: a new order of basidiomycetes. Mycologia, **82**, 48 – 58 [1990]

Okumura, Y.: Biosynthesis of viridogrisein. pp. 365 – 378. In: Kleinkauf, H.; von Döhren, H. (eds.): Biochemistry of Peptide Antibiotics. Walter de Gruyter Berlin [1990]

Omura, S. (ed.): The search for bioactive compounds from microorganisms. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest [1992]

Pinkerton, F.; Strobel, G.: Serinol as an activator of toxin production in attenuated cultures of *Helminthosporium sacchari*. Proc. Acad. Nat. Sci. USA, **73**, 4007 – 4011 [1976]

Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W.: Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden. 3. Auflage Springer-Verlag Berlin [1989]

- Radics, L.; Katjar-Peredy, M.; Casinovi, C. G.; Rossi, C.; Ricci, M.; Tuttobello, L.: Leucinostatins H and K, two novel peptide antibiotics with tertiary amine-oxide terminal group from *Paecilomyces marquandii* – Isolation, structure and biological activity. J. Antibiot., **40**, 714 – 716 [1987]
- Ritzau, M.; Heinze, S.; Dornberger, K; Berg, A.; Fleck, W. F.; Schlegel, B.; Härtl, A.; Gräfe, U.: Ampullosporin, a new peptaibol-type antibiotic from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 with neuroleptic activity in mice. J. Antibiot., **50**, 722 –728 [1997]
- Roepstorff, P.; Hojrup, P.; Moller, J.: Evaluation of fast atom bombardment mass spectrometry for sequence determination of peptides. Biomed. Mass Spectrometry, **12**, 181 – 188 [1985]
- Rossi, C.; Tuttobello, L.; Ricci, M.; Casinovi, C. G; Radics, L.: Leucinostatin D, a novel peptide antibiotic from *Paecilomyces marquandii*. J. Antibiot., **40**, 130 – 133 [1987]
- Rudakov, O. L.: Physiological groups in mycophilic fungi. Mycologia, **70**, 150 – 159 [1978]
- Sadakane, N.; Tanaka, Y.; Omura, S.: Hybrid biosynthesis of a new macrolide antibiotic by a daunomycin-producing microorganism. J. Antibiot., **36**, 921 –922 [1983]
- Sato, M.; Beppu, T.; Arima, K.: Properties and structure of a novel peptide antibiotic No. 1907. Agric. Biol. Chem., **44**, 3037 –3040 [1980]
- Ševčík, V.: Antibiotika aus Actinomyceten - Leifaden für die Isolierung und Charakterisierung. VEB Gustav Fischer Verlag Jena [1963]
- Schlee, D.; Kleber, H.-P. (Hrsg.): Wörterbücher der Biologie – Biotechnologie. Gustav Fischer Verlag Jena [1991]
- Schneider, G.; Anke, H.; Sterner, O.: New secondary metabolites from a mycophilic *Hansfordia* species. Nat. Prod. Lett., **10**, 133 –138 [1997]

Sharman, G. J.; Try, A. C.; Williams, D. H.; Ainsworth, A. M.; Beneyto, R.; Gibson, T. M.; McNicholas, C.; Renno, D. V.; Robinson, N.; Wood, K. A.; Wrigley, S. K.:  
Structural elucidation of XR586, a peptaibol-like antibiotic from *Acremomium persicinum*.  
Biochem. J., **320**, 723 – 728 [1986]

Shima, A.; Fukushima, K.; Arai, T.; Terada, H.: Dual inhibitory effects of the peptide  
antibiotics leucinostatins on oxidative phosphorylation in mitochondria.  
Cell Struct. Funct., **15**, 53 – 58 [1990]

Smith, D. G.: Techniques in enzyme hydrolysis. Cleavage of peptide chains. Pronase pp. 230  
– 231. In: Colowick S. P. & Kaplan, N. O. (eds.-in chief): Methods in enzymology. Vol.  
XI. Enzyme Structure (vol.ed.: Hirs, C. H. W.). Academic Press New York London [1967]

Sonntag, H.-G.: Infektionsgefahren nehmen auch in Mitteleuropa zu. In: Spektrum der  
Wissenschaften, Dossier: Seuchen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin  
New York [1997]

Steglich, W.; Fugmann, B.; Lang-Fugmann, S. (Hrsg.): Römpp-Lexikon Naturstoffe. Georg  
Thieme Verlag Stuttgart New York [1997]

Stengel, C.; Reinhardt, G.; Gräfe, U.: A simple screening procedure for microbial phase-  
transfer mediators conveying anions. J. Basic Microbiol., **32**, 339 – 345 [1992]

Strobel, G.; Yang, X.; Sears, J.; Kramer, R.; Sidhu, R. S.; Hess, W. M.: Taxol from  
*Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*.  
Microbiol., **142**, 435 – 440 [1996]

Strobel, G. A.; Hess, W. M.: Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an  
endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity.  
Chem. Biol., **4**, 529 – 536 [1997]

Strobel, G. A.; Torczynski, R.; Bollon, A.: *Acremomium* sp. – leucinostatin A producing  
endophyte of European yew (*Taxus baccata*). Plant Sci., **128**, 97 – 108 [1997]

Strobel, G. A.; Long, D. M.: Endophytic microbes embody pharmaceutical potencial – Specific associates of fungal endophytes with plant hosts represent a large untapped area for discovery. *ASM News*, **64**, 263 – 268 [1998]

Strobel, G. A.; Miller, R. V.; Martinez-Miller, C.; Condrón, M. M.; Teplow, D. B.; Hess, W. M.: Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiol.*, **145**, 1919 – 1926 [1999]

Takesako, K.; Mizutani, S.; Sakakibara, H.; Endo, M.; Yoshikawa, Y.; Msuda, T.; Sonokoyama, E.; Kato, I.: Precursor directed biosynthesis of aureobasidins. *J. Antibiot.*, **49**, 676 – 681 [1996]

Tanaka, Y.: Fermentation processes in screening for new bioactive substances. pp. 303 – 326. *In*: Omura, S. (ed.): The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest [1992]

Terashima, N.; Ishida, M.; Hamasaki, T.; Hatsuda, Y.: Isolation of bikaverin from *Mycogone jaapii*. *Phytochem.*, **11**, 2280 [1972]

Tezuka, Y.; Tasaki, M.; Huang, Q.; Hatanaka, Y.; Kikuchi, T.: Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. 6. 15-Hydroxyacorenone: New acorane-type sesquiterpene from the culture broth of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Liebigs Ann. Chem.* 2579 – 2580 [1997]

Thrum, H.: Untersuchungen über Polyen-Antibiotika. Dissertation B. Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie Jena der Akademie der Wissenschaften der DDR [1982]

Traber, R.; Hofmann, H.; Kobel, H.: Cyclosporins – new analogues by precursor directed biosynthesis. *J. Antibiot.*, **42**, 591 – 597 [1989]

Tsantrizos, Y. S.; Pischos, S.; Sauriol, F.; Widden, P.: Peptaibol metabolites of *Tolypocladium geodes*. *Can. J. Chem.* **74**, 165 – 172 [1996]

- Walzel, B.; Riederer, B.; Keller, U.: Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. Chem. Biol., **4**, 223 – 230 [1997]
- Weber, H. A.; Baenziger, N. C.; Gloer, J. B.: Podosporin A: a novel antifungal metabolite from the coprophilous fungus *Podospora decipiens* (Wint.) Niessl. J. Org. Chem., **53**, 4567 – 4569 [1988]
- Weber, H. A.; Gloer, J. B.: Preussomerins A – F: novel antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Preussia isomera* Cain. J. Org. Chem., **56**, 4355 – 4360 [1991]
- Whipps, J. M.: Effects of media on growth and interaction between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New Phytologist, **107**, 127 – 142 [1987]
- Whitmore, L.; Snook, C. F.; Wallace, B. A.: The Peptaibol Database. A World Wide Web resource currently found at: <http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/welcome.html> [1997]
- Whitmore, L.; Chugh, J.; Snook, C. F.; Wallace, B. A.: The Peptaibol Database. A World Wide Web resource currently found at: <http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/welcome.html> [2000]
- Wicklow, D. T.; Hirschfeld, B. J.: Evidence of a competitive hierarchy in post-fire ascomycetes. Mycologia, **71**, 47 – 54 [1979]
- Wicklow, D. T.; Wilson, D. M.: *Paecilomyces lilacinus*, a colonist of *Aspergillus flavus* sclerotia buried in soil in Illinois and Georgia. Mycologia, **82**, 393 – 395 [1990]
- Winkelmeier, P.; Glanner, B.; Lindl, T.: Quantification of cytotoxicity by cell volume and cell proliferation. ATLA, **21**, 269 – 280 [1993]
- Wöstemeyer, J.; Wöstemeyer, A.; Burmester, A.; Czempinski, K.: Relationships between sexual processes and parasitic interaction in the host-pathogen system *Absidia glauca-Parasitella parasitica*. Can. J. Bot., **73** (Suppl.1) S243 – S250 [1995]

## **Danksagung:**

Den Betreuern meiner Dissertation, Herrn Prof. Dr. habil. Udo Gräfe und Herrn Prof. em. Dr. habil. Werner F. Fleck, möchte ich für die interessante Themenstellung, die stets gewährte Unterstützung und die fördernden Diskussionen danken.

Frau Dr. Brigitte Schlegel danke ich für ihr stetiges Interesse und die umfangreiche fachlich-beratende Unterstützung bei der Durchführung der mikrobiologischen Arbeiten.

Herrn Dr. Stephan Heinze bin ich zu großem Dank für die Unterstützung bei der massenspektrometrischen Strukturaufklärung der im Rahmen der Dissertation isolierten Verbindungen verpflichtet. Frau Ing. Andrea Perner und Frau Rente Koch möchte ich hiermit für die exzellente technische Assistenz bei der Aufnahme der Massenspektren danken.

Herrn Dr. sc. Klausjürgen Dornberger danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der LC/MS-Messungen.

Allen nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern der Abteilungen Biostrukturchemie und Mikrobielle Infektionsbiologie des Hans-Knöll-Instituts für Naturstoff-Forschung Jena e. V., die mir bei der Anfertigung der Dissertation zur Seite standen, danke ich hiermit für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. habil. K. Walter Gams (Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn, Niederlande) möchte ich mich für die förderlichen Diskussionen und die Bereitstellung umfangreicher Quellen zum Thema „Mykoparasitismus“ im Vorfeld der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Gary A. Strobel (Department of Plant Pathology, Montana State University, Bozeman, Montana, USA) bin ich für die Überlassung des Stammes und Hinweise zur Kultivierung von *Acremonium spec.* Tbp-5 zu Dank verpflichtet.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes (Bonn) möchte ich an dieser Stelle für die materielle und idelle Förderung meiner Promotionsarbeit danken.

Nicht zuletzt bin ich Herrn Dr. Harald Bocker, Jena, und Herrn Dr. Gottfried Haubold (Thüringer Landesanstalt für Umwelt, Jena) zu großem Dank verpflichtet. Durch ihr Engagement während der Abiturausbildung und des Studiums wurde in mir das Interesse für Fragen der Angewandten Mikrobiologie und Biotechnologie geweckt und gefördert.

Meinen Eltern danke ich für ihre stetige Unterstützung während des Studiums.



**Selbständigkeitserklärung:**

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 18.06. 2000

## ***Lebenslauf:***

Name: Thomas Degenkolb

Geburtstag,

Geburtsort: 06.02. 1972 in Jena

Familienstand: ledig

### **Schulische Ausbildung:**

09/1979 - 08/1989 3. Polytechnische Oberschule „Dr. Theodor Neubauer“  
in Hermsdorf

09/1989 - 08/1991 Erweiterte Oberschule „Dr. Theodor Neubauer“ in  
Hermsdorf

### **Universitäre Ausbildung:**

09/1991 - 01/1997 Biologie-Studium an der Biologisch-Pharmazeutischen  
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

01/1995 - 06/1995 Auslandsaufenthalt an der School of Biological  
Sciences der Victoria University of Manchester  
(Großbritannien) im Rahmen des ERASMUS-  
Programmes der EU

Thema der Diplomarbeit: „Kinetik der  
Antibiotikabildung bei *Bacillus licheniformis*  
Stamm S 92“

17.01. 1997 Abschluß als Diplom-Biologe an der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

02/1997 - 03/1997 Praktikum „Introduction to Systematic Mycology“ am  
Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn (NL)

04/1997 - 05/2000 Doktorand am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-  
Forschung Jena e. V., Anfertigung der vorliegenden  
Dissertation unter Förderung durch die Studienstiftung  
des Deutschen Volkes

seit 06/2000 beschäftigt am Institut für Pflanzenbiochemie Halle/S.

Jena, den 18.06. 2000